

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Cirugía y Especialidades Quirúrgicas

***ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEASAS
IMPLICADAS EN LOS MECANISMOS DE INVASIÓN,
PROGRESIÓN Y METÁSTASIS DEL CÁNCER DE
PRÓSTATA***

Tesis presentada por
Ignacio Carretero Zamora
para optar al grado de
Doctor en Medicina y Cirugía

Barcelona, Junio 2006

Don Pedro Fernández Ruiz, Doctor en Medicina y Cirugía y Médico Especialista del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Barcelona, y Don Juan Alcover García, Doctor en Medicina y Cirugía y Especialista del Servicio de Urología y Transplante Renal del Hospital Clínico de Barcelona,

CERTIFICAN:

Que el trabajo: “**ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEASAS IMPLICADAS EN LOS MECANISMOS DE INVASIÓN, PROGRESIÓN Y METÁSTASIS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA**”, que presenta Ignacio Carretero Zamora para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Barcelona, ha sido realizado bajo su dirección desde los servicios de Anatomía patológica y Urología del Hospital Clínico de Barcelona.

Y que dada por finalizada la tesis, autorizan su presentación a fin de que pueda ser valorada por el tribunal que corresponda.

Barcelona, Junio 2006

Dr. D. Pedro Fernández Ruiz

Dr. D. Juan Alcover García

A Blanca

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. D. Pedro Fernández Ruiz, director de la presente tesis, por la dedicación y paciencia que me ha mostrado durante todo el periodo de elaboración de este trabajo. Sin sus conocimientos, consejos y ánimos, esta tesis no hubiera podido realizarse.

Al Dr. D. Juan Alcover García, director de la presente tesis, por el apoyo en la realización de este trabajo, en especial sus consejos y aportaciones bibliográficas.

Al Prof. D. Pablo Carretero González, Catedrático de Urología de la Universidad de Barcelona, por haber despertado mi interés en la Urología y sus constantes muestras de aliento a lo largo de mi carrera profesional.

Al Prof. Lorenzo Martín-Retortillo Baquer, Profesor Emérito y Catedrático de Derecho Administrativo de la Universidad Complutense de Madrid, Doctor Honoris Causa por las Universidades de Bolonia y Zaragoza, Miembro de la Real Academia Española de Jurisprudencia y Legislación, a quien tengo por referente académico y personal.

Al servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Barcelona, por su acogida y haberme permitido disponer de sus instalaciones y equipamiento para la realización de este trabajo. En especial a Iracema Nayach y Eva Fernández, por sus aportaciones técnicas en la elaboración de las matrices tisulares y las preparaciones inmunohistoquímicas.

Al servicio de Urología, por la aportación de los casos clínicos estudiados. A mis compañeros y amigos del servicio, entre ellos a los médicos adjuntos, a los que agradezco la formación recibida durante mi periodo de residencia.

Al Prof. Timothy Thomson (CSIC, IBM de Barcelona), por facilitar el Anticuerpo de la Hepsina y al Dr. Xavi Farré, por sus conocimientos y aportaciones realizados.

A D. Ángel Carretero Zamora, por su ayuda y colaboración en el tratamiento informático de este trabajo.

Al Dr. Raymond Pollock, por su colaboración en el estudio estadístico.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA	2
1.1. CP Silente y clínico.	4
2.. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.	4
2.1. Factores de riesgo.	4
3. AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO DEL CP.	10
3.1. Tacto rectal.	10
3.2.. Ecografía transrectal.	11
3.3. PSA.	11
4. HISTOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.	14
5. FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.	19
5.1. PSA sérico.	19
5.2. Estadio patológico.	20
5.3. Grado de Gleason.	22
5.4. Estado de los márgenes quirúrgicos.	24
5.5. Invasión perineural.	26
6. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.	27
6.1. Alteraciones moleculares.	27
6.2. Alteraciones cromosómicas.	30
7. MECANISMOS DE INVASIÓN Y METÁSTASIS.	30
7.1. MEC y moléculas de adhesión.	31
7.2. MEC y proteasas.	32
7.3. El receptor de andrógenos y su papel en la carcinogénesis prostática.	39
7.4. Antígeno Ki-67.	40
8. RESUMEN.	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
MATERIAL Y MÉTODOS	45
1. SELECCIÓN DE LOS CASOS.	46
2. SELECCIÓN DE LOS TEJIDOS.	46
3. ESTUDIO HISTOLÓGICO.	47
3.1. Obtención y transporte de la muestra.	47
3.2. Estudio macroscópico.	47
3.3. Inclusión del material en bloques de parafina.	49

3.4. Obtención de los cortes histológicos.	49
3.5. Tinción y montaje de los cortes histológicos.	49
3.6. Elaboración de las matrices tisulares.	49
3.7. Inmunohistoquímica.	58
4. VALORACIÓN.	62
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	65
RESULTADOS	67
A. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.	68
1. Estudio descriptivo.	68
2. Estudio analítico.	72
B. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES.	75
1. Expresión de Catepsina B.	75
2. Expresión de Catepsina L.	79
3. Expresión de Hepsina.	84
4. Expresión de Maspina.	86
5. Expresión del Receptor de Andrógenos.	89
6. Expresión de Ki-67.	91
7. Resumen.	92
C. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA Y PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD.	93
DISCUSIÓN	107
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	132

INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata constituye uno de los problemas sanitarios más importantes en los países desarrollados. El progresivo envejecimiento de la población ha contribuido al aumento de su prevalencia. Además, los continuos avances tanto en los métodos diagnósticos como terapéuticos, permiten diagnosticarlo de forma precoz y tratarlo eficazmente, reduciendo los efectos secundarios derivados de estos tratamientos. Así mismo, los continuos progresos en investigación sobre la biología de esta neoplasia han permitido un mayor conocimiento sobre su naturaleza y comportamiento biológico.

Sin embargo, todavía resulta extremadamente difícil el discernir entre el tumor silente, que no va a producir ninguna manifestación clínica, del clínico, que se comportará de una forma agresiva, adquiriendo la capacidad de invadir y metastatizar, comprometiendo la supervivencia de los enfermos. Es por ello que se hace perentorio el estudio de marcadores capaces de predecir el comportamiento del cáncer de próstata, para poder identificar estos tumores agresivos y poder tratarlos de manera efectiva sin “sobretratar” el tumor silente, evitando así los efectos secundarios y el impacto que el tratamiento produciría en la calidad de vida de estos pacientes.

El objetivo de este trabajo es el estudiar la importancia de productos celulares implicados en los mecanismos de invasión, progresión y metástasis del cáncer de próstata y su posible utilidad clínica como marcadores predictivos del comportamiento biológico de esta neoplasia.

1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata (CP) es una de las enfermedades más prevalentes en la actualidad. A escala mundial, constituye la cuarta enfermedad neoplásica diagnosticada en el hombre¹. En Estados Unidos representa el tumor visceral más frecuente, y la segunda causa de mortalidad cáncer-específica tras el cáncer de pulmón². La incidencia del CP en este país ha experimentado oscilaciones en los últimos años, siendo el de los varones afro-americanos el grupo étnico en el que se ha observado la incidencia más alta (en 1995 era de 170 por 100.000 habitantes mientras que en los americanos de origen asiático e hispano las incidencias en este periodo de tiempo eran de 82 por 100.000 habitantes y 104 por 100.000 habitantes, respectivamente.) La incidencia de CP en los varones americanos caucásicos es de 110 por 100.000 habitantes^{3,4}. Globalmente, la incidencia de CP en los Estados Unidos es de 179.300 nuevos casos diagnosticados en 1999, siendo la mortalidad en torno a 37.000 casos en ese

mismo año⁵. Es cierto que la mortalidad en Norteamérica ha ido descendiendo en los últimos años, a pesar del envejecimiento de la población⁶.

La incidencia a escala mundial varía considerablemente de unas áreas geográficas a otras, siendo los países occidentales los que mayor número de casos nuevos presentan. En Europa las incidencias más altas las encontramos en los países escandinavos, siendo notorias las diferencias de mortalidad por CP, si las comparamos con los países del sur de Europa (24 por 100.000 habitantes en Suecia y 13 por 100.000 en España⁷). En los países de la Unión Europea se diagnostican unos 85.000 nuevos casos al año, siendo el tumor más frecuente en los países escandinavos, si bien en ciertas regiones de Italia (Turín, Parma, Varese) ocupa entre el cuarto y sexto lugar. El área geográfica de menor incidencia de CP en Europa se encuentra en Cracovia, Polonia⁸.

Las tasas de incidencias más bajas se encuentran en las zonas orientales, como Japón, Hong-Kong, Singapur y China. Es en este país, y más concretamente en el área de Quidong, donde encontramos una de las tasas de incidencia más bajas del mundo (en esta zona el CP se sitúa como el vigésimo tumor en orden de frecuencia, detrás de los de vejiga y riñón)^{8,9}.

En cuanto a datos nacionales, no conocemos la incidencia de CP en España al no disponer de estudios epidemiológicos a escala nacional, pero sí disponemos de estudios realizados por diferentes Comunidades Autónomas que pueden ser extrapolables a todo el país. Así, en la Comunidad de Madrid, la tasa de incidencia durante el año 2000 fue 100,4 casos por 100.000 habitantes¹⁰.

Esta variabilidad que presentan los indicadores epidemiológicos del CP según las áreas geográficas que se estudien, sugiere la hipótesis de la existencia de factores medioambientales que pueden desempeñar un papel etiológico importante en el CP, hipótesis que viene reforzada por diferentes estudios epidemiológicos realizados sobre poblaciones migratorias, encontrándose un aumento en la incidencia de CP en japoneses emigrados a EEUU, si se compara con la incidencia en Japón.¹¹, y en emigrantes polacos emigrados a Francia¹². Merece la pena señalar que a pesar de estos incrementos en la tasa de incidencia del CP en inmigrantes, estas poblaciones no alcanzan las incidencias de la población autóctona. Se desconoce si existe disminución en el riesgo de contraer CP si se emigra hacia áreas geográficas de baja incidencia.

1.1 CP SILENTE Y CP CLÍNICO.

Diferentes estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto las diferencias existentes entre el CP incidental, diagnosticado en muestras de necropsia, y el prevalente, identificado a partir de los diferentes diagnósticos clínicos.

Guileyardo y colaboradores encontraron unas cifras en torno al 30% de CP silente identificado en estudios autopsicos. Habiendo estimado en un 3% el riesgo de muerte por CP en la misma población, concluyeron que las lesiones silentes son mucho más frecuentes que aquellas que producen enfermedad clínicamente detectable y por tanto responsable de la mortalidad¹³.

Es comprensible atribuir una mayor agresividad biológica al CP clínico que al silente, si además consideramos el hecho de que la identificación de metástasis en las necropsias es muy poco frecuente¹⁴. La incidencia del CP silente puede a su vez estar influida por variables como el hábitat¹⁵ y la edad (entre el 15% y el 30% de CP silente en varones mayores de 50 años y entre el 60% y el 70% en varones mayores de 80 años^{16,17}.)

Si tomamos los datos epidemiológicos de forma global, basándonos en las cifras conjuntas del CP clínico y silente, podemos concluir que el CP, muy frecuentemente, es una enfermedad indolente que no modifica la supervivencia del enfermo. Por consiguiente, las lesiones histológicas catalogadas como CP silente obedecen a transformaciones morfológicas de la glándula, sin embargo alteraciones mayores (presumiblemente mutacionales¹⁸) serían necesarias para conferir a las células prostáticas el fenotipo agresivo¹⁹.

Esta evidente desproporción entre la frecuencia CP silente y el clínico hace pensar en posibles factores etio-patogénicos que podrían modificar la historia natural del CP.

2. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

2.1. FACTORES DE RIESGO DEL CP

2.1.1. Edad

El CP es una enfermedad que se presenta en varones de edad avanzada, siendo entre la 6ª y la 8ª década de la vida el período en el que se diagnostica con mayor frecuencia. Más del 75% de los casos se diagnostican en mayores de 65 años.

La incidencia de CP tiende a aumentar con la edad, siendo por encima de los 80 años, el grupo de edad donde la tasa es mucho mayor²⁰. Aunque en los últimos tiempos se ha detectado una disminución en la incidencia en este grupo de edad, en los varones con edades comprendidas entre los 50 y los 59 años ha aumentado hasta alcanzar cifras de 105 por 100.000 habitantes²¹.

Este incremento en la incidencia de CP en este grupo de edad se debe principalmente a los programas de diagnóstico precoz.

Se ha encontrado que la edad es un factor asociado a la progresión de CP silente a clínico, además de una asociación directamente proporcional entre la edad, el volumen tumoral y el grado de diferenciación histológica²².

En la **tabla I** se presentan las edades de máxima incidencia de CP con sus tasas de incidencia ajustadas. Es importante señalar que la edad de máxima incidencia es superior a los 80 años. (Tomado de EPIDEMIOLOGÍA DESCRIPTIVA Y ANALÍTICA EN ONCOLOGÍA UROLÓGICA: G.OTERO MAURICIO, A. FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, J. GIL FABRA)

POBLACION	Edad de máxima incidencia	Tasa específica/ 100.000 hbt/año
Atlanta Negros	80-84	1821,01
Utah	80-84	1261,63
Canadá, Saskat	80,84	1072,99
Suecia	80-84	1035,90
Noruega	>85	932,70
Suiza (Ginebra)	>85	1085,90
Alemania RF	80-84	599,02
Australia	>85	893,22
Finlandia	>85	907,89
Francia Doubs	80,84	650,95
Dinamarca	80-84	665,20
Italia Varese	>85	537,77
Alemania RD	80-84	356,07
Polonia Cracovia	>80	231,86
China Quidong	>85	28,33

Tabla I

2.1.2. Raza

Las tasas de incidencia²³ y mortalidad²⁴ más altas se encuentran en la población afroamericana de los Estado Unidos de América. El riesgo relativo ajustado para la edad en la comunidad negra norteamericana es 1,8 veces mayor que en los caucásicos, lo que implica un incremento del 85% de riesgo de padecer la enfermedad, y del 114% de morir por ella.

Comparando estos datos con los de la población negra africana, esta última presenta incidencias más bajas²⁵. Este hecho hace pensar que las migraciones implican cambios medioambientales que modifican el riesgo de padecer CP. Se han estudiado diferentes tipos de factores constitucionales y ambientales en varones negros africanos y norteamericanos^{26,27}, sin que se hallan podido encontrar asociaciones significativas que expliquen este fenómeno.

2.1.3. Factores dietéticos

La posible implicación de la dieta en el etiopatogenia del CP viene avalada por diferentes estudios epidemiológicos que relacionan los alimentos con la incidencia de diferentes neoplasias^{28,29,29-34}.

Hirayama y colaboradores atribuyeron a los cambios en los hábitos alimentarios de los japoneses el aumento en la incidencia de CP que se ha producido en Japón en los últimos 30 años³⁵, y se ha comprobado la correlación existente entre el CP con otras neoplasias en las que es bien conocida su relación con la ingesta de determinados nutrientes³⁶.

- **Té verde**

El té verde ha sido recientemente estudiado por su posible valor en la prevención del CP, ya que su elevado contenido de polifenoles le confiere una gran cantidad de propiedades bioquímicas y farmacológicas, como una potente actividad antioxidante, capacidad de inhibir la proliferación celular e inducir los fenómenos de apoptosis, bloqueo del ciclo celular o la modulación del metabolismo tumoral³⁷.

- **Grasas**

El consumo de grasas de origen animal se ha asociado a mayor riesgo de CP³⁸⁻⁴¹. Se ha observado que, en áreas geográficas donde el CP tiene gran incidencia (EEUU), el consumo de este tipo de grasas es abundante, mientras que en áreas donde la incidencia es más baja (países asiáticos), la dieta es rica en fibra y pobre en grasas animales. Los cambios en la incidencia de CP en emigrantes asiáticos en los EEUU apoyarían esta hipótesis⁴².

Se cree que el consumo de grasas se asocia a CP porque alteran los niveles séricos de andrógenos⁴³⁻⁴⁵ que son fuente de radicales libres⁴⁶ y sus metabolitos pueden ser carcinógenos⁴⁷.

- **Vitamina A**

La vitamina A desempeña una función importante en el metabolismo celular⁴⁸. Aunque su déficit se ha postulado como factor de riesgo para padecer CP, no ha podido confirmarse tal afirmación⁴⁹, tampoco que su aporte adicional tenga efectos preventivos sobre el CP⁵⁰.

- **Vitamina E**

Con función antioxidante, protege a las membranas celulares de las lesiones causadas por los radicales libres. Se ha encontrado una asociación entre los suplementos de vitamina E y una reducción del 32% en la incidencia y del 41% en la mortalidad por CP⁵¹.

- **Vitamina D**

El déficit de vitamina D, como resultado de una menor exposición a la luz ultravioleta, ha sido relacionado con un mayor riesgo de padecer CP⁵²⁻⁵⁴. De la misma forma se ha comprobado que el 1,25-colecalciferol es capaz de inhibir la proliferación de células neoplásicas prostáticas en distintos tipos de líneas celulares^{55,56}, por lo que su la dieta rica en vitamina D puede resultar beneficiosa frente al CP.

De la misma forma se ha relacionado la dieta rica en calcio con mayor riesgo de padecer CP⁵⁷, por la relación inversamente proporcional entre las concentraciones de calcio y de vitamina D.

- **Licopene**

El licopene es un carotenoide que se encuentra a alta concentraciones en el tomate. Ha sido estudiado profusamente al haber sido implicado como factor dietético protector (debido a su potente función antioxidante) frente al CP⁵⁸⁻⁶⁴.

- **Selenio**

Componente mineral de la glutation-peroxidasa (también con función antioxidante) ha sido implicado en una reducción del riesgo de padecer CP⁶⁵.

2.1.4. Factores Expositivos

- **Cadmio**

El cadmio, componente de numerosos productos herbicidas y fertilizantes⁶⁶, es considerado como una sustancia cancerígena involucrada en la etiopatogenia del CP^{67,68}, si bien existen estudios que no han encontrado tal asociación entre los tumores prostáticos y dicho metal.⁶⁹ Se piensa que su efecto cancerígeno se debe a su acción competitiva sobre el zinc, elemento necesario para la síntesis y reparación del ADN⁷⁰.

- **Alcohol y tabaco**

El consumo de alcohol tiende a aumentar las síntesis de estrógenos y a disminuir los niveles plasmáticos de testosterona, pudiendo así reducir el riesgo de CP, pero no se han encontrado resultados concluyentes a tal efecto.^{71,72} Tampoco se ha encontrado asociación entre el consumo de café^{73,74}.

A pesar de que el tabaco es una sustancia determinante en la etiopatogenia de varias neoplasias de origen epitelial⁷⁵ (pulmón, vejiga, laringe...) no se han encontrado datos concluyentes en relación con el CP⁷⁶⁻⁷⁹.

2.1.5. Historia familiar del cáncer de próstata

Se ha constatado en diferentes estudios que las personas con antecedentes familiares de CP tienen un mayor riesgo de contraer la enfermedad que las personas que no los tienen⁸⁰⁻⁸². El cálculo de este riesgo ha resultado ser del doble para las personas con un familiar de primer grado afecto. Este riesgo llega a ser 5 ó 6 veces mayor cuando se trata de más de un familiar de primer grado los que padecen la enfermedad ⁸³.

Se piensa que esta forma hereditaria corresponde aproximadamente al 9% del total de CP, pero puede llegar casi al 43% en su forma de presentación precoz (en menores de 55 años)^{84,85}.

Se ha observado la alteración del gen HPC1^{86,87} (situado en el locus 1q24-25 del cromosoma 1) en pacientes afectados de CP hereditario. Gromberg et al ⁸⁸ estudiaron la alteración

de este gen observando una menor edad media al diagnóstico, mayor estadio patológico y mayor grado histológico en los pacientes portadores del gen alterado, lo que ha sugerido una mayor agresividad biológica del CP hereditario, aunque otros autores no han encontrado diferencias en cuanto a la respuesta al tratamiento o a la evolución posterior con respecto al CP esporádico^{89,90}.

2.1.6. Hormonas y cáncer de próstata

Se sabe que los andrógenos juegan un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo de la glándula prostática. También se les ha involucrado en la etiopatogenia del CP, debido principalmente a su acción estimulante sobre la proliferación celular e inhibitoria sobre la apoptosis de las células prostáticas^{91,92}.

También se ha observado una mayor concentración de testosterona en tejido prostático neoplásico que en tejido normal o hiperplásico⁹³ y se ha atribuido la mayor incidencias de CP de los varones afro-americanos a una mayor concentración de testosterona con respecto a los caucásicos^{94,95}.

Este estímulo hormonal sobre el CP constituye la base fisiopatológica para su tratamiento mediante bloqueo androgénico tanto quirúrgico como farmacológico. Más adelante se comentará la importancia de los andrógenos y su receptor con más detalle.

2.1.7. Vasectomía

Algunos autores han observado un mayor riesgo de CP en pacientes vasectomizados⁹⁶⁻¹⁰⁰, mientras otros no han encontrado tal asociación¹⁰¹.

Se ha apuntado al tiempo transcurrido desde la realización de la vasectomía y al mayor seguimiento de estos pacientes por parte del urólogo como posibles sesgos o factores de confusión en la relación vasectomía y CP^{102,103}.

2.1.8. Hiperplasia Benigna de Próstata

La relación entre HBP y CP ha sido motivo de interés y se puede encontrar en la literatura estudios que avalan dicha relación¹⁰⁴, y que la rechazan al no encontrar resultados que indiquen un mayor riesgo de CP en los pacientes afectados de HBP¹⁰⁵.

2.1.9. Diabetes Mellitus y Cáncer de Próstata

Diferentes estudios han señalado el probable efecto protector de la diabetes mellitus sobre el CP. Giovannucci et al¹⁰⁶ observaron una reducción del riesgo de CP en pacientes

diabéticos, tanto mayor cuanto mayor es el tiempo de evolución de la diabetes. Rosemberg et al¹⁰⁷ observaron esta disminución del riesgo en la población blanca.

2.1.10. Cirrosis Hepática y Cáncer de Próstata

Se ha encontrado una asociación entre la cirrosis hepática y un menor riesgo de CP¹⁰⁸. Las alteraciones en los niveles séricos de hormonas sexuales (aumento de estrógenos y disminución de testosterona), que se producen en esta afección hepática podrían explicar su efecto protector frente al CP¹⁰⁹.

3. AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Las variaciones en la incidencia y mortalidad del CP que se han detectado en los últimos años, se explican por el empleo generalizado del antígeno prostático específico (PSA) en su diagnóstico¹¹⁰. Se calcula que desde el advenimiento del PSA, aproximadamente entre un 70-80% de los CP se diagnostican en estadio localizado, comparado con el 20-30% de CP localizado que se diagnosticaba en la era pre-PSA¹¹¹. Entre los años 1990 y 1994, se produjo una disminución del 52% en lo diagnósticos de enfermedad avanzada, como consecuencia de la utilización del PSA¹¹².

La determinación del PSA sérico, el tacto rectal y biopsia prostática Eco-dirigida, constituyen los procedimientos comúnmente empleados en la práctica urológica para el diagnóstico precoz del CP.

3.1 TACTO RECTAL

La exploración física de la glándula prostática a través del tacto rectal, constituye la prueba diagnóstica más sencilla y barata para evaluar la presencia de CP. El tacto permite explorar la cara posterior de la próstata, o zona periférica, donde asienta el 80% de todos los tumores prostáticos¹¹³. Un tacto rectal anormal es indicativo de biopsia prostática, independientemente del nivel sérico de PSA.

Sin embargo, se trata de una prueba sometida a gran subjetividad por parte del explorador. El valor predictivo positivo (VPP) se encuentra entre el 21-53%¹¹⁴⁻¹¹⁶, dependiendo de la raza, edad y el nivel de PSA sérico¹¹⁷. El tacto tiende a diagnosticar enfermedad localmente avanzada no siendo útil para detectar tumores no palpables. La probabilidad de detectar la enfermedad en estadio localizado aumenta en un 78% cuando se complementa con la determinación de PSA¹¹⁸.

3.2 ECOGRAFÍA TRANSRECTAL

Desde su descripción en 1968¹¹⁹ y posterior aplicación al estudio prostático, la ecografía transrectal se ha convertido en la técnica de imagen más útil en la práctica urológica. Se trata de una exploración extraordinariamente válida para la valoración de la morfología prostática así como para determinar el volumen de la glándula, necesario en numerosas ocasiones para indicar una determinada técnica quirúrgica en el tratamiento de la HBP.

De la misma forma, la ecografía transrectal ha permitido realizar biopsias prostáticas con mayor precisión y mejor toleradas por el paciente, que las técnicas de biopsia convencionales¹²⁰.

Sin embargo, su baja sensibilidad (entre 70-92%), especificidad (40-65%) y valor predictivo positivo (17-35%)¹²⁰, no hacen recomendable su utilización como técnica de diagnóstico precoz del CP^{121,122}.

3.3 ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO (PSA)

El PSA (HK3) se considera en la actualidad el marcador tumoral más importante no sólo con relación al diagnóstico precoz, sino también como parámetro de control de respuesta al tratamiento y monitorización en el seguimiento de los enfermos de CP¹²³. Se trata de una serín-proteasa codificada por el gen de la familia de la kalikreínas, situado en el cromosoma 19¹²⁴, cuya función principal es la licuefacción del coágulo seminal¹²⁵. Se ha detectado PSA en tejido extraprostático, así como en el suero de la mujer¹²⁶, datos que cuestionan su especificidad con relación al CP.

En su mayor parte circula unida a proteínas (α -1-antiquimiotripsina, α -2-macroglobulina) aunque una pequeña fracción también lo hace de forma libre.

Tradicionalmente el punto de corte por encima del cual la determinación sérica de PSA se considera "anormal" se ha establecido en 4 ng/dl¹²⁷, si bien, el punto de corte óptimo está actualmente en revisión tratando de disminuir el número de biopsias innecesarias sin perder

porcentaje de detección^{128,129}. Se estima que aproximadamente el 70-80% de varones con PSA superior a 4 ng/dl no padecen CP¹³⁰.

La determinación del PSA sérico es prueba de mayor valor predictivo positivo con relación al CP^{131,132}, además aumenta el VPP del tacto rectal. A pesar de ello, no es aconsejable utilizarlo como única prueba diagnóstica, ya que aproximadamente un 25% de pacientes con CP no presentan una elevación anómala del PSA.

Con el propósito de ampliar la especificidad del PSA en el diagnóstico de CP, sobre todo en los casos en los que su determinación sérica se encuentra entre los valores 4 y 10 ng/dl¹²⁰, y así reducir el número de biopsias negativas sin perder poder de detección, se han estudiado los diferentes parámetros:

✓ **Ratio PSA Libre/total.**

Como se ha comentado con anterioridad, el PSA puede encontrarse de forma libre o unido a proteínas. Originariamente es secretado como proenzima, sufre la acción de enzimas presentes en el líquido seminal (provocan la lisis o el recorte de los residuos 145-146 lisina-lisina¹³³ que provocan su inactivación.) Este es el PSA libre, funcionalmente inactivo y que no se une a proteínas. En condiciones normales, la barrera fisiológica que constituye la membrana basal permite la acción continuada de las enzimas que inactivan el PSA, por lo tanto, cuando éste pasa a la circulación lo hará en su forma libre, no unido a proteínas. Por el contrario, en situaciones de disrupción de la membrana basal y desestructuración del tejido prostático, (como sucede en el cáncer) el tiempo de exposición del PSA a sus enzimas inactivadoras sería menor, y al pasar al torrente sanguíneo lo haría unido a proteínas. Esto explicaría la menor concentración de PSA libre que circula en sangre en los pacientes con CP comparados con los sujetos normales¹³⁴. La determinación de la ratio PSA libre/total aumentaría la especificidad del test, reduciendo el número de biopsias innecesarias¹³⁵.

✓ **Densidad de PSA.**

Se trata de la razón entre el PSA sérico y el volumen de la glándula prostática¹³⁶. El punto de corte comúnmente aceptado es el de 0.15¹³⁷, sin embargo se han alcanzado distintos resultados en cuanto a la especificidad del test si se modifica este punto de corte o se determina únicamente el volumen de la zona de transición¹³⁸ de la próstata¹³⁹⁻¹⁴².

✓ **Velocidad de PSA.**

Carter et al¹⁴³ observaron que el PSA sérico aumentaba más rápidamente en los pacientes con CP que en los individuos normales, por lo que se postuló que el incremento del PSA con relación al tiempo aumentaría la especificidad de la prueba. Actualmente el punto de corte se establece en 1 ng/dl/ año, si bien la oscilación biológica del PSA limita la utilidad de este parámetro.

✓ **Rangos de PSA específicos por edad.**

En un intento de aumentar la sensibilidad de la prueba en pacientes jóvenes (que se beneficiarían del diagnóstico precoz y tratamiento agresivo) y la especificidad en sujetos mayores (y evitar biopsias innecesarias), Oesterling et al¹⁴⁴ propusieron rangos de PSA específicos para la edad.

RANGOS DE PSA POR EDAD	
EDAD (años)	PSA (ng/dl)
40-49	2.5
50-59	3.5
60-69	4.5
70-79	6.5

✓ **PSA complexed**

Se trata de la fracción de PSA unida a proteína (α -1-antiquimiotripsina). Brawer et al¹⁴⁵ observaron mejores resultados en el diagnóstico precoz de CP dosificando PSA complexed, que los obtenidos con PSA total o ratio Libre/total, sin embargo otros estudios no lo consideran útil en el diagnóstico diferencial entre HBP Y CP¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

4. HISTOPATOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

El CP presenta lesiones preneoplásicas que desde el punto de vista histológico expresan la progresión fenotípica de las células epiteliales desde el tejido normal al neoplásico, con lo que se hace teóricamente posible el estudio de la progresión tumoral desde sus primeros estadios. En la glándula prostática, esta lesión premaligna es la llamada Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN), y que de forma muy semejante a Hiperplasia Atípica y al Carcinoma "in situ" mamarios (CIS), progresaría a lesión invasiva^{149,150} (Fig.1).

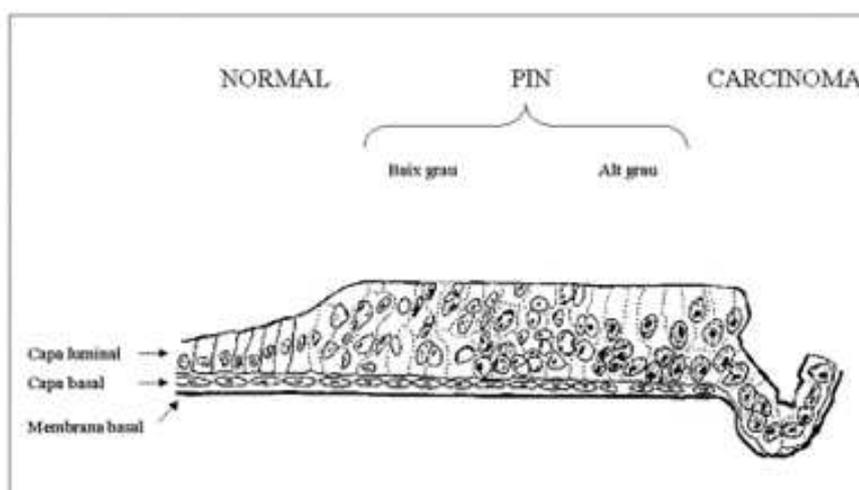


Fig. 1: Tomado de Bostwick et al. Eur Urol 30:145, 1996

4.1 HISTOLOGÍA DE LOS ESTADIOS DE PROGRESIÓN

4.1.1 Glándula prostática normal

Microscópicamente, la próstata normal está compuesta por tejido glandular en un 70% y estroma en un 30%. Las glándulas se dividen en área secretora o acinar y en conductos excretores con estructura histológica similar¹⁵¹. Se trata de glándulas biestratificadas, con una capa de células secretoras que dan a la luz, (presentan tinción positiva para PSA) y otra de células basales, paralela a la membrana basal que expresan citoqueratinas¹⁵² de alto peso molecular.

Las células de la capa basal presentan escaso citoplasma, al contrario que las células lumbinales, que con una configuración cilíndrica, constan de amplio citoplasma y núcleo en situación basal.

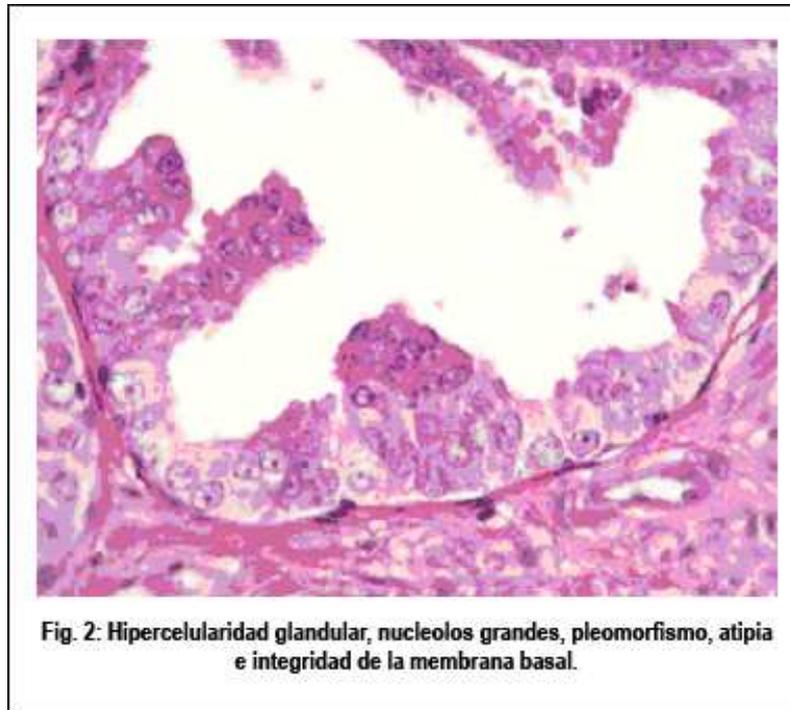
4.1.2 Neoplasia intraepitelial prostática (PIN)

Se trata de una proliferación neoplásica, limitada exclusivamente al epitelio glandular y que no sobrepasa la membrana basal, constituyendo la lesión premaligna precursora del CP^{149,153}. Entre sus alteraciones morfológicas podemos citar la hiper celularidad manifiesta de la glándula, células con nucleolos grandes, presencia de atipias nucleares (hipercromatismo), superposición de núcleos, glándulas separadas por pequeña cantidad de estroma normal, papilas grandes y superficies lumbinales ondulantes.

La característica fundamental que diferencia esta lesión del CP es la integridad de la membrana basal. La expresión de la citoqueratina de alto peso molecular 34βE12¹⁵⁴, confirma la presencia de células basales, siendo útil en el diagnóstico diferencial entre PIN y CP.

Inicialmente se clasificó el PIN en función de su grado de displasia en leve, moderada y grave. Actualmente se emplea el término PIN de alto grado para la displasia moderada y grave, y PIN de bajo grado para la displasia leve. Dado que es difícil distinguir entre PIN de bajo grado y tejido prostático benigno, y que su presencia en material de biopsia no aumenta el riesgo de encontrar carcinoma en

biopsias posteriores^{155,156}, el PIN de bajo grado no suele informarse en los dictámenes patológicos.



4.1.3 Adenocarcinoma de próstata

El tipo histológico más frecuente es el adenocarcinoma acinar de próstata¹⁵⁷. Suele mostrar diferentes patrones arquitecturales (glandular de pequeño y gran tamaño, cribiforme y celular difuso), presentando como características citológicas células de núcleos grandes, de contornos irregulares, hiper cromáticos y lo que es más relevante, nucleolos prominentes (mayores de 1 μ de diámetro). A veces presentan nucleolos múltiples y no es infrecuente observar mitosis.

A continuación se resumen los diferentes tipos de cáncer de próstata y sus características histológicas¹⁵⁸.

TIPO HISTOLÓGICO	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
ADENOCARCINOMA DUCTAL	<i>Proliferación epitelial florida, papilar, cribiforme o sólida en los conductos periuretrales prostáticos. Puede retener células basales detectables con la citoqueratina 34βE12.</i>	<i>Generalmente presenta un estadio avanzado sin un nivel de PSA elevado. Curso más agresivo.</i>
CARCINOMA INDIFERENCIADO DE CÉLULA PEQUEÑA <i>(NEUROENDOCRINO DE ALTO GRADO)</i>	<i>Idéntico a su contrapartida en el pulmón u otras localizaciones.</i>	<i>Pronóstico muy malo, con una media de supervivencia inferior a 2 años. Se puede asociar a síndromes paraneoplásicos como el síndrome de Cushing, SIADH y otros.</i>
CARCINOMA MUCINOSO <i>(COLOIDE)</i>	<i>Por lo menos el 25% del tumor se compone de mucina extracelular, algunos con mucina extraglandular, y también presenta células tumorales sueltas o agrupadas dentro de lagos de mucina. Una variante rara incluye el carcinoma de próstata de tipo colónico, sin embargo este patrón es motivado por la diseminación contigua de un cáncer de recto.</i>	<i>Similar o ligeramente peor que el adenocarcinoma convencional.</i>
CARCINOMA DE CÉLULAS EN ANILLO DE SELLO	<i>Características típicas de un carcinoma de células en anillo de sello convencional, con células tumorales que muestran inmunoreactividad para fosfatasa ácida prostática (PAP) y PSA. La mucina puede no estar presente. Frecuentemente se encuentra mezclado con adenocarcinoma acinar típico.</i>	<i>Muy raro en su forma pura, pronóstico muy desfavorable.</i>
	<i>Se manifiesta principalmente como un carcinoma adenoescamoso mixto,</i>	<i>El carcinoma adenoescamoso mixto y el carcinoma de células escamosas</i>

<p>CARCINOMA ESCAMOSO</p>	<p>pero formas puras de carcinoma de células escamosas con características típicas de malignidad se pueden observar.</p>	<p>puro puede aparecer después de terapia hormonal o radioterapia por un adenocarcinoma acinar típico. El carcinoma escamoso puro es muy raro y tiene muy mal pronóstico, siendo refractario al tratamiento de privación hormonal.</p>
<p>CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONALES</p>	<p>Puede ser primario de próstata o de la uretra prostática, pero generalmente es debe a afectación secundaria por un carcinoma de vejiga. El tumor puede ser "in situ" o infiltrar la próstata. Debe buscarse también diseminación pagetoide, que raramente es puede extender a lo largo de los conductos eyaculadores a través de la próstata hacia las vesículas seminales.</p>	<p>Pronóstico desfavorable, importante distinguir del adenocarcinoma, dado que es refractario al tratamiento de privación hormonal.</p>
<p>CARCINOMA ADENOIDE QUÍSTICO O DE CÉLULAS BASALES</p>	<p>Nidos de células basaloideas redondas u ovaladas, frecuentemente con un patrón cribiforme. Buscar mucina luminal y material eosinófilo parecido a membranas basales.</p>	<p>Muy raro, con metástasis o fallecimiento no definidos.</p>
<p>CARCINOMA DE TIPO LIMFOEPITELIOMA</p>	<p>Islas de glándulas estrechamente agrupadas en medio de un estroma linfoide denso.</p>	<p>Sólo dos casos descritos, con un significado pronóstico incierto.</p>
<p>CARCINOMA SEUDOHIPERPLÁSICO</p>	<p>Papilas, glándulas atípicas grandes, capa basal ausente, ramificaciones, cuerpos amiláceos, engrosamiento nuclear y nucléolos. Rara vez asociado a mitosis, secreción de mucina, PIN adyacente e invasión</p>	<p>No establecidas. Recientemente descrito.</p>

	<i>perineural</i>	
--	-------------------	--

5. FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Dependiendo de la evolución esperada del CP (estadio localizado, localmente avanzado o metastásico) un paciente puede ser tratado bien con intención curativa (habitualmente con tratamientos agresivos que añaden morbi-mortalidad), o bien de forma paliativa, con el fin de mejorar su calidad de vida. Si además y tal como se ha expuesto anteriormente, tenemos en cuenta la necesidad de discriminar el CP silente del clínico y potencialmente letal, el uso de marcadores pronósticos de la enfermedad puede ser de gran importancia a la hora de decidir estrategias terapéuticas e identificar a los enfermos susceptibles de tratamiento.

Los factores pronósticos, entendidos como características de una enfermedad que pueden predecir la evolución de la misma en un individuo determinado, que clásicamente se han venido empleando en el manejo clínico del CP son el PSA sérico, el estadio TNM y el grado histológico de Gleason.

5.1. PSA SÉRICO

El valor pronóstico del PSA sérico es considerable, sobre todo a la hora de predecir la afectación ganglionar¹⁵⁹ por CP. La probabilidad de encontrar ganglios linfáticos afectados aumenta de forma directamente proporcional al valor del PSA, de tal manera que menos del 1% de los pacientes con PSA menor a 4 ng/dl presentaban adenopatías, mientras que 27% con valores de PSA superiores a 50 ng/dl tenían ganglios linfáticos afectados.

Además, tiene valor predictivo a la hora de diagnosticar metástasis óseas ya que se ha observado que en menos de 0.5% de los individuos afectados de CP con cifras de PSA inferiores a 10 ng/dl presentaban metástasis óseas¹⁶⁰.

5.2. ESTADIO PATOLÓGICO

El estadiaje del CP es fundamental para establecer las estrategias terapéuticas adecuadas y obtener criterios clínico-patológicos homogéneos. Aunque la clasificación clásica de Whitmore-Jenett todavía sigue vigente, la más utilizada en la actualidad es la clasificación TNM (revisión de 2002).

Es importante destacar que el estadiaje patológico es más útil que el clínico para predecir la evolución ya que proporciona información sobre el volumen tumoral, el estado de los márgenes quirúrgicos, extensión extracapsular, y la afectación de vesículas seminales y ganglios linfáticos.

El estadiaje patológico de los casos clínicos estudiados en nuestro trabajo (como se comentará más adelante), fueron establecido aplicando la clasificación TNM de 1997, que es la que estaba en vigor en el momento de la recogida de datos (ver material y métodos: selección de los casos).

En la siguiente página se reproduce la clasificación TNM actualizada (2002).

<p>ESTADIO LOCAL: (T: tumor primario)</p>	<p><i>Tx: no se puede evaluar el tumor primario</i></p> <p><i>T1: tumor no evidente clínicamente, no palpable ni visible mediante técnicas de imagen.</i></p> <p><i>T1a: tumor detectado como hallazgo casual en \leq 5% del tejido resecado</i></p> <p><i>T1b: tumor detectado como hallazgo casual en \geq 5% del tejido resecado.</i></p> <p><i>T1c: tumor identificado mediante biopsia (por ejemplo por PSA elevado)</i></p> <p><i>T2: tumor limitado a la próstata (un tumor detectado en uno o ambos lóbulos mediante punción biopsia, pero no palpable ni visible por técnicas de imagen, se clasifica como T1c)</i></p> <p><i>T2a: tumor que afecta a la mitad de un lóbulo.</i></p> <p><i>T2b: tumor que afecta a más de la mitad de un lóbulo.</i></p> <p><i>T2c: tumor que afecta a ambos lóbulos</i></p> <p><i>T3: tumor que se extiende a través de la cápsula prostática</i></p> <p><i>T3a: Extensión a tejido adiposo periprostático (unilateral o bilateral)</i></p> <p><i>T3b: invasión de la vesícula seminal</i></p> <p><i>T4: tumor fijo que invade estructuras adyacentes diferentes a las vesículas seminales</i></p> <p><i>T4a: cuello vesical, esfínter externo, recto,</i></p> <p><i>T4b: elevadores del ano y/o pared pélvica.</i></p>
<p>AFECCIÓN GANGLIONAR: (N: ganglios linfáticos regionales)</p>	<p><i>Nx: no se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.</i></p> <p><i>N0: no hay metástasis ganglionares regionales.</i></p> <p><i>N1: metástasis en ganglios linfáticos regionales.</i></p>
<p>ENFERMEDAD METASTÁSICA: (M: Metástasis)</p>	<p><i>Mx: no evaluable la presencia de metástasis lejanas</i></p> <p><i>M0: no evidencia de metástasis</i></p> <p><i>M1: presencia de metástasis a distancia</i></p> <p><i>M1a: ganglios linfáticos no regionales</i></p> <p><i>M1b: metástasis en huesos</i></p> <p><i>M1c: metástasis en otras localizaciones</i></p>

5.3. GRADO DE GLEASON

Existen en la actualidad diferentes sistemas de gradación histológica, (sistemas de Mostofi, Broders, Gaeta, MD Anderson¹⁶¹⁻¹⁶³), siendo en la actualidad el más ampliamente utilizado el sistema de Gleason^{164,165}.

Este sistema fue desarrollado por el Veteran Administration Cooperative Urological Research Group (VACURG) y su característica principal, que lo diferencia de otros sistemas de gradación, es que se basa no en datos citológicos sino en la morfología glandular y el patrón de crecimiento tumoral en el estroma prostático.

Sistema de gradación de GLEASON

- **Patrón 1:** Glándulas uniformes, en masas circunscritas, bien diferenciadas, pequeñas y agrupadas.
- **Patrón 2:** Similar a 1, con moderada variación de tamaño y morfología (**Fig.3**)
- **Patrón 3:** Similar a 2, con marcada irregularidad en tamaño y morfología de las glándulas. Hay glándulas pequeñas o células individuales invadiendo el estroma (**Fig.4**)
- **Patrón 4:** Tumor de células fusionadas, infiltrante con células claras (**Fig.5**)
- **Patrón 5:** carcinoma anaplásico, con mínima diferenciación glandular, infiltrando difusamente el estroma (**Fig.6**)

La gradación se lleva a cabo asignando una puntuación del 1 al 5 a los dos patrones más frecuentes (primario y secundario), siendo el resultado final la suma de ambos. Los valores entre 2 y 4 corresponderían a tumores bien diferenciados, entre 5 y 7 los moderadamente diferenciados y entre 8 y 10 los tumores pobremente diferenciados.

Tanto el grado primario como el secundario tienen valor pronóstico, de ahí la importancia del grado combinado. Además de gozar de una aceptable reproducibilidad interobservador¹⁶⁶, este sistema de gradación tiene como ventajas su rapidez de valoración, comparado con otros sistemas de apreciación de características citológicas, y su facilidad de aprendizaje.

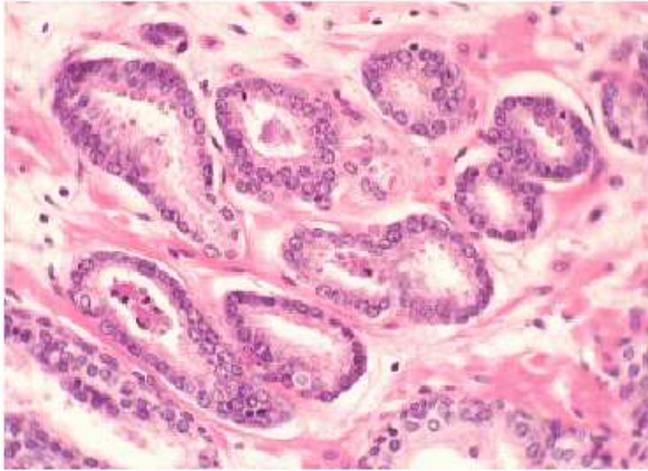


Fig. 3: Glándulas uniformes, bien diferenciadas, pequeñas y agrupadas.

Fig. 4: Marcada irregularidad en tamaño y morfología de las glándulas. Hay glándulas pequeñas o células individuales invadiendo el estroma.

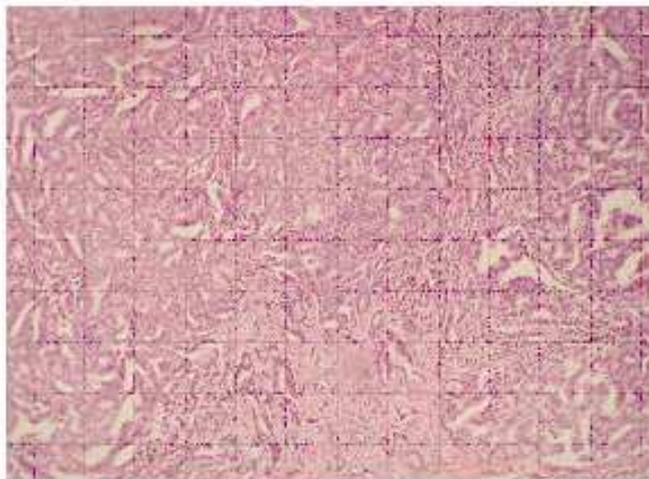
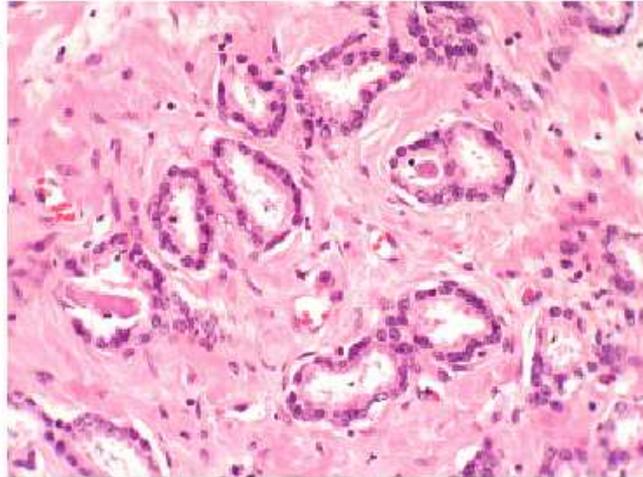
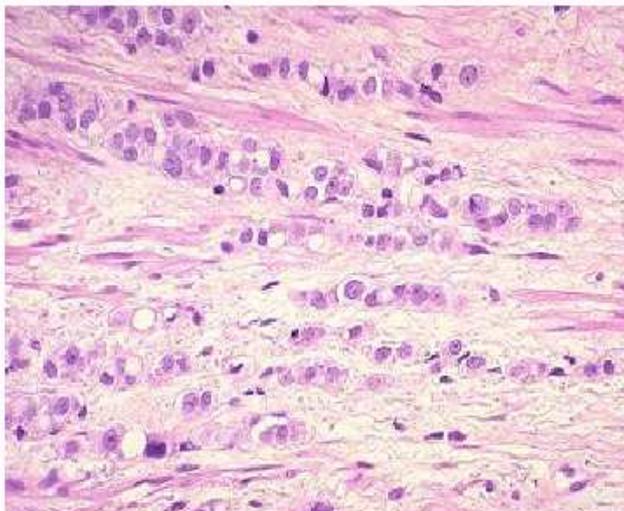


Fig. 5: Tumor de células fusiformes, infiltrante con células claras.

Fig. 6: Carcinoma anaplástico, con mínima diferenciación glandular, infiltrando difusamente el estroma.



5.4 ESTADO DE LOS MÁRGENES QUIRÚRGICOS

El estado de los márgenes quirúrgicos es un factor con valor pronóstico demostrado. La OMS recomienda que se informe de la presencia, localización y extensión de todos los márgenes quirúrgicos así como de la presencia de glándulas benignas próximas a ellos (**Fig.7-8**), con el fin de alertar a los clínicos de la existencia de tejido prostático residual productor de PSA tras la cirugía¹⁶⁷.

La localización de un margen de resección positivo tiene una importancia significativa, ya que, cuando es el ápex prostático el que se encuentra afecto, la repercusión en cuanto a progresión y pronóstico, es mayor que en otras localizaciones. Sin embargo, cabe señalar que sólo aproximadamente el 50% de los pacientes con márgenes quirúrgicos afectados progresarían después de una prostatectomía radical¹⁶⁸.

Aún así el estado de los márgenes confiere información predictiva por si mismo, formando parte de numerosos algoritmos pronósticos¹⁶⁹.

En la página siguiente se muestran la **figura 7**, donde se aprecia un tumor prostático de estadio patológico pT2 (órgano-confinado), pero con el margen de resección afecto, y la **figura 8**, que muestra un tumor localmente avanzado (pT3), pero con los márgenes de resección libres.

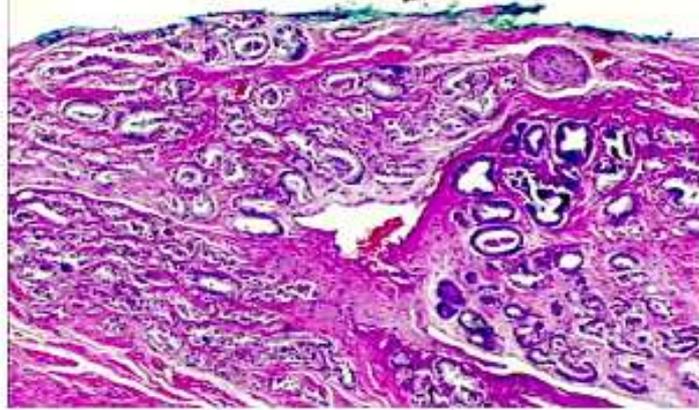


Fig. 7: pT2 con margen afecto.

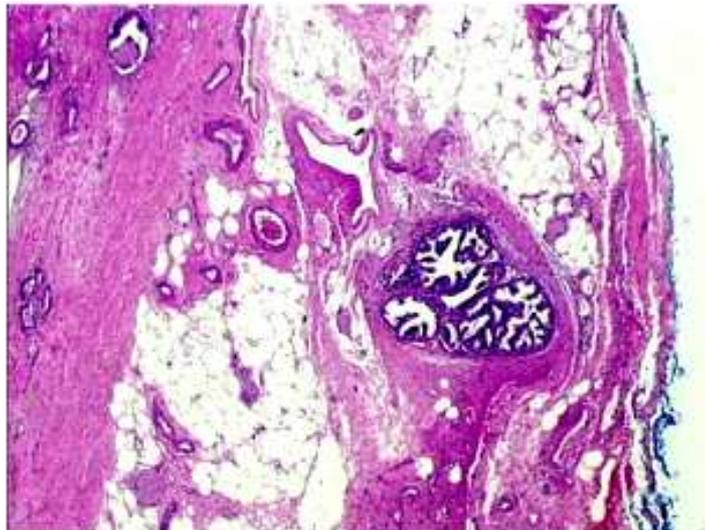


Fig. 8: pT3 con margen libre.

5.5 INVASIÓN PERINEURAL

La invasión perineural es frecuente en adenocarcinomas, encontrándose hasta en un 38% de las biopsias¹⁷⁰. Junto con la secreción mucinosa y las glomerulaciones, constituye un hallazgo histológico diagnóstico de CP en las biopsias por aguja¹⁷¹. Se ha demostrado su valor predictivo de progresión tras la prostatectomía radical¹⁷². Además, recientemente se ha sugerido que la presencia de invasión perineural en muestras de biopsia con aguja puede desempeñar un papel predictor independiente de la evolución de la enfermedad una vez realizada la prostatectomía radical en cánceres localizados, independientemente de los niveles de PSA¹⁷³.

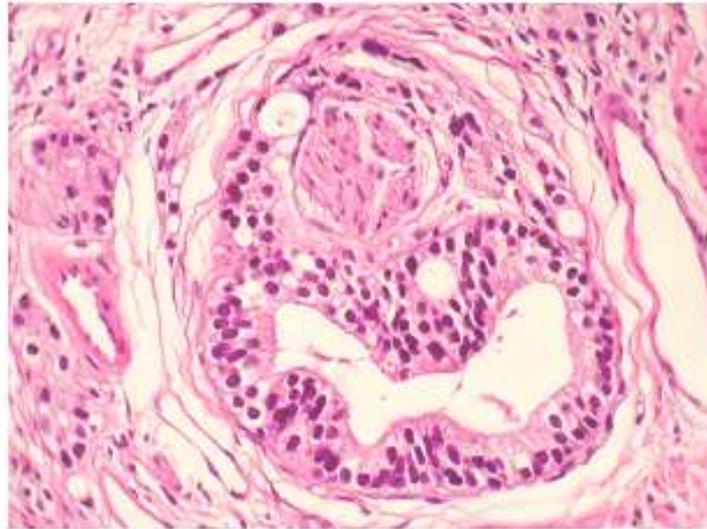


Fig. 9: Glándulas tumorales infiltrando alrededor de una terminación nerviosa.

Diferentes autores^{174,175} han incluido los factores clínico-patológicos con valor pronóstico en nomogramas, con el fin de predecir el estadio patológico del CP de forma preoperatoria. Partin y cols¹⁷⁶ elaboraron uno de los más utilizados en la práctica clínica.

6.BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

La transformación neoplásica de una célula constituye un proceso complejo en el que diferentes alteraciones genéticas hacen que dicha célula escape al control fisiológico de regeneración celular, de tal manera que, eludiendo la apoptosis, se perpetúa en el ciclo celular, proliferando de forma anárquica, adquiriendo la capacidad de invadir tejidos adyacentes y eventualmente metastatizar. Esta transformación obedece fundamentalmente a la activación de oncogenes (genes que codifican proteínas implicadas en la activación del ciclo celular y cuya sobreexpresión puede favorecer el desarrollo de un tumor¹⁷⁷) o la inactivación de genes supresores tumorales (genes encargados de controlar de forma fisiológica la división celular, inducir la apoptosis y la reparación de alteraciones genéticas, evitando su propagación).

6.1 ALTERACIONES MOLECULARES

6.1.1 Oncogenes

Los oncogenes son genes normales (proto-oncogenes) activados que se relacionan frecuentemente con la estimulación de la proliferación celular¹⁷⁸. Entre los implicados en la carcinogénesis prostática destacan los siguientes:

a) Bcl-2:

La familia de genes Bcl-2, descrita por primera vez en el año 1984 al descubrirse su asociación con la translocación cromosómica característica del linfoma folicular $t(14;18)(q32;q21)$ ¹⁷⁹, se encuentra sobreexpresada hasta en el 100% de las células en el PIN de alto grado (HGPIIN) y en el 60% de las de CP¹⁸⁰.

Implicado en los mecanismos de apoptosis, su alteración permitiría a las células portadoras de daño genético eludir la muerte celular programada y proliferar sin control, desempeñando así un papel relevante en el inicio y progresión del tumor.

Se ha observado una respuesta pobre al tratamiento con radioterapia en pacientes afectados de CP que presentan sobreexpresión de bcl-2¹⁸¹.

b) Ras:

La familia Ras, de la que se conocen tres subtipos: H-Ras, K-Ras y N-Ras¹⁸², y considerada como uno de los grupos de oncogenes más relevantes, se han

asociado a tumores con alta capacidad de producir metástasis¹⁸³. Codificando una proteína anómala permitirían la persistencia de la señal de transducción¹⁸⁴ y la proliferación de células transformadas. Su sobreexpresión se ha asociado a mal pronóstico y fenotipo metastásico¹⁸⁵, y a la diferenciación hacia la independencia androgénica^{186,187} en el CP. Además, su sobreexpresión parece tener utilidad en la predicción de adenopatías, constituyendo una alternativa a los métodos quirúrgicos de estadiaje¹⁸⁵.

c) c-Myc:

La familia de oncogenes nucleares c-Myc se encuentra sobreexpresada en gran variedad de tumores¹⁸⁸ y parecen estar involucrados en los mecanismos del ciclo celular que regulan la progresión a la fase G1. La sobreexpresión de c-Myc se ha relacionado con el desarrollo y progresión del CP. Recientemente se ha encontrado una asociación entre la expresión conjunta de c-Myc y su regulador Caveolina-1 y la progresión del CP, lo que podría determinar su eventual utilidad clínica¹⁸⁹.

6.1.2 Genes supresores de tumores

Los genes supresores de tumores, o antioncogenes, son necesarios para reprimir de forma fisiológica la división celular. Su alteración o ausencia de expresión provocaría la proliferación celular incontrolada.¹⁷⁸ A diferencia de los oncogenes, para que el gen quede alterado es necesario que las mutaciones o deleciones afecten a los dos alelos¹⁹⁰⁻¹⁹². La pérdida de uno ellos no implicaría la aparición de un tumor, pero sí el riesgo genético de desarrollarlo, al faltar el otro alelo del gene supresor¹⁸⁵. Los antioncogenes comúnmente asociados a la patología prostática son P53, gen del retinoblastoma (Rb), P16^{ink4}, P21^{Cip1} y P27^{kip1}.

a) P53:

El gen supresor tumoral TP53 se encuentra alojado en 17q13.1 y codifica una proteína nuclear compuesta por 393 aminoácidos, y 53 Kd de peso molecular, conocida como p53¹⁹³. Esta proteína desempeña un papel crucial en la regulación y control del ciclo celular, ya que detiene la división en casos de alteración genética, permitiendo a su vez la reparación del DNA, e induciendo la apoptosis si estas reparaciones son inviables. La mutación de este gen daría lugar a una proteína p53

anómala, incapaz de detener el ciclo celular, lo que permitiría la proliferación incontrolada de células alteradas. De la misma manera, esta p53 anómala no sería capaz de atravesar la membrana nuclear debiendo permanecer en el núcleo celular¹⁹⁴.

Se ha encontrado una expresión aumentada de p53 mutada en tumores de próstata de alto grado, hormono-resistentes y metastásicos¹⁹⁵⁻¹⁹⁷, por lo que se considera implicada en los estadios tardíos de CP, siendo menos frecuente su transformación en etapas más tempranas¹⁹⁸.

También se ha constatado la asociación entre la sobreexpresión de p53, con la amplificación del gen HAR (receptores androgénicos)¹⁹⁹.

b) Gen del Retinoblastoma:

Este gen codifica una proteína nuclear (pRb), con una función inhibitoria importante en la transición desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular y su alteración parece estar implicada en la transformación maligna de las células.

Aunque en el CP se ha encontrado una pérdida de heterocigosidad de hasta un 27% de este gen²⁰⁰ no parece asociarse a un mal pronóstico en este tumor^{201,202}.

c) Gen P16^{ink4}:

Este gen se encuentra situado en 9p21¹⁸⁵ y codifica la proteína p16, inhibidora de las kinasas dependientes de ciclinas evitando la fosforilación de pRb e impidiendo el proceso de división celular. Su alteración tiene el mismo efecto que el del gen Rb²⁰³. Su sobreexpresión en PIN de alto grado se ha asociado con una recidiva bioquímica precoz en pacientes con CP²⁰⁴.

d) p21^{cip1}:

Se trata de la proteína de 189 aminoácidos codificada por un gen localizado en el cromosoma 6p21.2. Dada su importancia en la regulación de p53 en la detención del ciclo celular, este gen es considerado como un gen supresor tumoral.

e) p27^{kip1}:

Es la proteína de 198 aminoácidos codificada por un gen situado en el cromosoma 12q13. Fue descrito como inhibidor en células bloqueadas por el factor de crecimiento en transformación β (TGF- β). Esta proteína se encuentra intensamente

expresada en las células no proliferantes. Recientemente se ha demostrado la función supresora tumoral de esta proteína en células prostáticas, independientemente de su papel regulador de la proliferación celular²⁰⁵.

6.2 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN EL CP

La gran mayoría de tumores prostáticos que presentan alteraciones cromosómicas, suelen corresponder a casos poco diferenciados, con estadio clínico localmente avanzado o incluso metastásicos. Las anomalías cromosómicas más frecuentes son²⁰⁶⁻²⁰⁹:

- Pérdida del cromosoma Y
- Delección de 7q22, 7q31 y trisomía del cromosoma 7
- Delección de 8p21 y monosomía del cromosoma 8
- Ruptura de 10q23 y pérdida de 10q24

7. MECANISMOS DE INVASIÓN Y METÁSTASIS

La progresión del CP se lleva a cabo a través de un proceso secuencial, en el que una vez producida la transformación neoplásica, las células tumorales invaden los tejidos adyacentes, penetran los vasos, alcanzan el torrente circulatorio y asientan en órganos diana donde continúan desarrollándose y constituyendo las metástasis.

Para ello, las células tienen que atravesar la matriz extracelular (MEC) y formas particulares de la misma, como las membranas basales²¹⁰, para lo que necesitan de mecanismos de anclaje a la MEC para su posterior degradación y así poder atravesarla. Estos mecanismos se basan en la existencia de moléculas de adhesión para elementos de la MEC y sistemas enzimáticos que la degraden.

De la misma forma, estas células deben adquirir motilidad para poder desprenderse del compartimento tumoral y atravesar la MEC. Esta locomoción obedece al equilibrio continuo entre adhesión y desprendimiento intercelular a través de las moléculas de adhesión^{211,212}.

En la actualidad, las moléculas de adhesión se clasifican atendiendo a su estructura protéica²¹³ en:

- Superfamilia de Ig.
- Familia de Cadherinas.
- Integrinas.
- Selectinas.

7.1. MEC y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

La matriz extracelular de la mayoría de los tejidos epiteliales se compone de laminina y colágenos tipo IV, I, VII, , IX, XIV, además de otras moléculas no colágenas como, sialoproteína, osteopontina, osteonectina, fibronectina, vitronectina y trombospondina²¹⁴. La membrana basal tiene como principales componentes la laminina y el colágeno IV²¹⁵.

Todas estas moléculas participan en el mecanismo de remodelado de la MEC, fenómeno continuo de recambio fisiológico necesario para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, que puede verse alterado en situaciones patológicas como en el CP²¹⁶.

Se ha comprobado que varias de estas moléculas presentan cambios en su expresión al analizarse en tejido prostático neoplásico (modificaciones en la expresión de cadherina, sialoproteína^{217,218} y colágeno VII²¹⁹).

7.1.1 Cadherinas.

Las cadherinas son una familia multigénica de glicoproteínas de adhesión que proporcionan el mantenimiento de las uniones célula-célula y participan como mediadores en la migración celular^{220 221}.

La pérdida de expresión de estas moléculas se ha asociado al fenotipo invasivo tumoral precisamente por su papel en la adhesión celular²²², siendo consideradas en la actualidad como moléculas supresoras de la invasión ²²³.

Dentro de esta familia destaca la *E-Cadherina*, una molécula de adhesión calcio-dependiente encargada del mantenimiento de la capa epitelial de los tejidos. A medida

que un tumor adquiere capacidad para invadir, progresar y metastatizar, la expresión de E-Cadherina se va perdiendo²²⁴.

Se ha observado asociación entre la pérdida de su expresión y grados indiferenciados y estadios avanzados de CP, por lo que posee valor pronóstico^{225,226}.

7.1.2 Integrinas.

El comportamiento celular en cuanto a la pérdida de la adhesión y a la adquisición de la motilidad celulares, se acompaña de cambios en la expresión de receptores de adhesión, sobre todo de los formados por la familia de las integrinas. Compuestas por dos cadenas (α y β), se comportan como moléculas heterodiméricas transmembrana implicadas en funciones de organogénesis, regulación de la expresión génica, proliferación, diferenciación, migración y muerte celular²²⁷. Se ha observado una asociación entre el aumento de expresión del heterodímero $\alpha 6\beta 1$ y la invasión de las vesículas seminales por parte de células prostáticas tumorales^{228,229}.

También facilitan la formación de metástasis óseas ya que posibilitan el asentamiento de células tumorales en el hueso (especialmente el heterodímero $\alpha v\beta 3$), al mediar en la adhesión de éstas con la vitronectina y la osteopontina, ambas componentes esenciales de MEC ósea²³⁰.

7.2. MEC Y PROTEASAS

Ya hemos señalado que la MEC, y formas especiales de la misma como las membranas basales, constituyen una auténtica barrera para las células tumorales. Para poder atravesar esta barrera, es necesario que se produzcan cambios en la producción de enzimas proteolíticos específicos que degraden la MEC. Estos cambios pueden ser inducidos bien por las células tumorales o bien por la propia MEC como fenómeno de respuesta del huésped al tumor.

Genéricamente, estas proteasas son clasificadas en cinco categorías²³¹:

- Cisteínicas (catepsinas B, L, S, K, Q, caspasas...)
- Aspárticas (catepsinas D, E...)

- Serín-proteasas: (u-PA, plasmina, Hepsina...)
- Metaloproteasas (MMP-2, MMP-9...)
- Treonín-proteasas (proteasoma).

7.2.1 Metaloproteasas (MMP):

Son una familia de endopeptidasas con especificidad hacia gran cantidad de sustratos, entre los que se encuentra diferentes componentes de la MEC, (colágenos I, II, III, IV, laminina y fibronectina²³².)

La acción proteolítica de las MMP sobre la MEC se ve amplificada al perderse la expresión de los TIMPS, sus inhibidores tisulares.

Diferentes tipos de MMP han sido implicados en la progresión del CP. Lichtinghagen et al²³³ descubrieron que la MMP-9 se encontraba sobreexpresada en el CP y no en el tejido prostático normal. También en cultivos celulares de cáncer de próstata como PC-3 y DU-145, se encontró sobreexpresión de MT-1 MMP (metaloproteasa de membrana tipo 1)²³⁴. De la misma forma se ha encontrado sobreexpresión no de MMP-2, pero sí de su ratio respecto a su inhibidor TIMP-1²³⁵.

NEP 24.11 o endopeptidasa neutra (neprilisina) es otra MMP de superficie implicada en la progresión del CP²³⁶. Su expresión está disminuida en células cancerígenas obtenidas de piezas de prostatectomía radical, no siendo así en tejido prostático hiperplásico²³⁷.

7.2.2 U-PAR (receptor del activador del plasminógeno urokinasa-like)

Se trata de una serín-proteasa transmembrana que sirve de receptor para el activador del plasminógeno (u-PA), permitiendo la activación de la plasmina desencadenando la cascada de las proteasas que llevarían a cabo la degradación de los componentes de la MEC.

Se ha comprobado que la producción de u-PA se corresponde con una mayor capacidad de las células tumorales para unirse y activar el plasminógeno, lo que sugiere que la secreción de u-PA y los niveles del complejo u-PA y u-PAR son típicos del fenotipo invasivo de muchos tumores²³⁸.

También se ha encontrado asociación entre u-PA y mayor grado histológico y estadios avanzados en el CP²³⁹.

La plasmina es una potente serín-proteasa capaz de degradar la MEC²⁴⁰ y activar otras proteasas como MMP-9, estromelina o MMP-3, colagenasa intersticial (MMP-1) etc.²⁴¹.

7.2.3 Catepsinas

Las catepsinas, del griego “καθελειν” o “kathesein” (digerir) son proteasas localizadas en el interior de los lisosomas, capaces de degradar los diferentes componentes de la matriz extracelular (MEC). Por ello han sido implicadas en los fenómenos de invasión y metástasis de diferentes neoplasias humanas, como el cáncer de pulmón²⁴², esófago²⁴³, estómago²⁴⁴, cerebro²⁴⁵, colon²⁴⁶, ovario²⁴⁷, mama²⁴⁸⁻²⁵¹, neoplasias de cabeza y cuello²⁵², vejiga urinaria²⁵³ y próstata^{254,255}. Los continuos avances y mejoras de las técnicas biológicas para la caracterización de proteínas han permitido el conocimiento de un mayor número de catepsinas, habitualmente diferentes en su estructura molecular, pero bastante similares en cuanto a su función. Su papel putativo en los mecanismos de invasión, progresión y metástasis de los tumores humanos les ha convertido no sólo en potenciales marcadores pronósticos tumorales sino en objetivos de investigación para futuras terapias moleculares.

a) Catepsina B

La catepsina B (Cat B) se caracterizó por primera vez en el año 1973²⁵⁶. Se trata de una proteinasa cisteínica lisosomal de 339 aminoácidos codificada por un gen situado en 8p22²⁵⁷. Se encuentra implicada en el recambio normal de proteínas en las células de mamíferos. También ha sido relacionada con los fenómenos de procesamiento antigénico²⁵⁸, angiogénesis²⁵⁹, y degradación de diferentes componentes de la MEC y la membrana basal, como el colágeno tipo IV, la fibronectina y la laminina²⁶⁰. Cat B es capaz de activar tanto la forma soluble como la ligada al receptor de la célula tumoral del activador del plasminógeno urokinasa-like (u-PA) y otras proteasas²⁶¹.

Se ha informado de la importancia de la expresión de Cat B como factor pronóstico en el cáncer de pulmón (en los diferentes tipos histológicos excepto el de célula pequeña²⁴²). También se ha encontrado la asociación entre su

sobreexpresión y un estadio tumoral avanzado y una menor supervivencia el cáncer de colon²⁴⁶ y su posible utilidad como marcador de transformación maligna de los meningiomas²⁶².

Cat B y Cáncer de próstata

Diferentes estudios han puesto de manifiesto la presencia de Cat B en el cáncer de próstata. Fernández y colaboradores demostraron una mayor positividad de esta proteasa en el tejido prostático neoplásico en comparación con las observadas en el tejido normal, la hiperplasia y el PIN de alto grado, apuntando así su posible implicación en la transformación maligna de las glándulas prostáticas²⁶³. Sinha y colaboradores estudiaron la expresión de Cat B en muestras de cáncer de próstata agrupados según el grado de Gleason y comprobaron que ésta se encontraba expresada de forma heterogénea, siendo su positividad más intensa en los tumores pobremente diferenciados²⁶⁴. Estas observaciones sugieren la probable relación de la Cat B con el fenotipo agresivo del tumor.

Al estudiar la razón entre Cat B y su inhibidor estefina A se comprobó que en los tumores agresivos, existía una preponderancia del enzima sobre el inhibidor, independientemente del grado de diferenciación, lo que no ocurre en tumores silentes o no agresivos, reforzándose la hipótesis de la utilidad clínica de Cat B como factor pronóstico de la evolución²⁶⁵. También se ha encontrado una asociación entre la razón Cat B>estefina A y la incidencia de metástasis ganglionares²⁶⁶.

Miyake y colaboradores²⁶⁷ han encontrado una mayor concentración sérica de Cat B en pacientes con cáncer de próstata que en el grupo control de individuos sanos. Además, esta concentración sérica resultó ser mayor en los pacientes con enfermedad extraprostática que en los de enfermedad órgano-confinada. Sin embargo no se encontró asociación con la supervivencia cáncer-específica.

b) Catepsina L

Mucho menos estudiada que la Cat B, esta proteasa fue purificada por primera vez en 1971, a partir de lisosomas hepáticos de la rata²⁶⁸. Se trata de una de las proteasas más ubicuas, siendo además de las más activas en la degradación de sustratos como la azocaseína, colágeno y elastina²⁶⁹. Se piensa que puede desempeñar un papel regulador del ciclo celular a través del proceso proteolítico de factores de transcripción o degradando p21²⁷⁰.

La catepsina L (Cat L), es otra proteasa cisteínica lisosomal con un papel crucial en el catabolismo proteico intracelular. Ha demostrado poseer la actividad colagenolítica y elastinolítica más potente de todas las catepsinas in vitro^{271,272}. Ha sido implicada en diferentes procesos patológicos como necrosis miofibrilar de las miopatías²⁷³, en la isquemia miocárdica²⁷⁴ y en la respuesta tubular renal frente a la proteinuria²⁷⁵.

Debido a sus propiedades proteolíticas ha sido relacionada con los fenómenos de invasión y progresión de diferentes neoplasias, como meningiomas²⁶², mama²⁷⁶ y pulmón²⁴², si bien, los resultados no han sido tan alentadores como los de la Cat B.

Cat L y cáncer de próstata

La presencia de Cat L en diferentes cultivos celulares prostáticos como LNCaP, DU 145 y PC 3 y la capacidad que dichas líneas celulares poseen para invadir la MATRIGEL® (una preparación sintética de características físicas similares a las membranas basales) han indicado la posible relación entre esta proteasa y el fenotipo invasivo en el cáncer de próstata.²⁷⁷

7.2.4 Hepsina

El gen de la hepsina codifica para una serín-proteasa tipo II transmembrana de 51 kDa, localizada en la membrana plasmática de las células, con su porción C-terminal hacia la superficie externa de las mismas. Fue identificada originariamente en el tejido hepático humano, encontrándose presente en niveles significativos en diferentes tipos celulares como el cáncer de mama, nervios periféricos o el hepatocarcinoma. La hepsina es producida en la mayoría de los tejidos, pero es en el hígado donde se encuentra en concentraciones más altas²⁷⁸.

Entre sus funciones destacan el crecimiento celular y la activación del factor VII de la coagulación²⁷⁹ iniciando la cascada de la coagulación en la superficie celular, resultando en la formación de trombina.

La sobreexpresión de la hepsina se ha observado en diferentes neoplasias humanas como en el cáncer de ovario²⁸⁰, el de riñón²⁷⁹ y el de próstata.

Hepsina y cáncer de próstata

Diferentes estudios de expresión génica, empleando los “microarrays” de DNA, han puesto de manifiesto que el gen para la hepsina, es uno de los que más frecuentemente se encuentran sobreexpresados en el carcinoma de próstata humano²⁸¹⁻²⁸⁵. El mRNA de la hepsina se encuentra elevado en el 90% de los tumores prostáticos²⁸⁶. Esta elevación se acompaña de un aumento de los niveles de la proteína. Esta sobreexpresión confirmaría la importancia de la hepsina no sólo como marcador para el cáncer de próstata, sino como posible objetivo terapéutico.

Se ha observado su sobreexpresión en todos los estados evolutivos del cáncer de próstata, incluyendo el PIN de alto grado, adenocarcinoma localizado y las lesiones metastáticas, sin embargo el papel de la hepsina en la evolución del cáncer de próstata es objeto de debate. Mientras se acepta que, de forma global, se encuentra sobreexpresada en esta neoplasia, no está claro si sus niveles de expresión se correlacionan con la evolución de estos enfermos.

Estudios in vivo con ratones transgénicos han puesto de manifiesto que la sobreexpresión de hepsina promueve tanto la progresión del cáncer como la aparición de metástasis²⁸⁷ al provocar un debilitamiento de la adhesión del epitelio al estroma, resultando en la desorganización y disrupción de la membrana basal. Sin embargo esta sobreexpresión en líneas celulares derivadas del cáncer de próstata metastásico reduce la capacidad de estas células para invadir la Matrigel® al inhibir la motilidad celular²⁸⁸, poniendo en cuestión el papel favorecedor de la progresión de esta proteasa.

7.2.5. Maspina

La actividad de la hepsina se debe en gran medida a los niveles celulares de las serpinas (inhibidores de las serín-proteasas), encargadas de determinar la actividad enzimática en la superficie celular, modulando la degradación de la matriz extracelular y la invasión tumoral.

La maspina o serpina B5, es una proteína de 42 kDa perteneciente a la superfamilia de las serpinas, con las que guarda una gran similitud estructural (las serpinas mantienen una secuencia de aminoácidos casi idéntica²⁸⁹) y cuya presencia ha sido demostrada en células epiteliales normales de la mama, placenta, próstata, timo, testículo, cavidad oral, intestino delgado, piel y córnea²⁹⁰.

El gen que codifica para maspina fue originalmente identificado como un gen supresor de clase II en las células del cáncer de mama, localizado en el cromosoma 18q21.3²⁸¹. Se da la circunstancia de que es en esta región donde se producen más frecuentemente las pérdidas de heterocigosidad en diferentes tumores, entre ellos los de mama, colon y próstata²⁹¹.

Se trata de una proteína citoplasmática, que también es secretada a la superficie celular. Se ha comprobado que tiene la capacidad para inhibir diferentes proteasas, entre ellas uPA²⁸⁹ y hepsina²⁹² así como la angiogénesis²⁹³ y la invasión tumoral al favorecer la adhesión celular a la membrana basal y a los componentes de la matriz extracelular. Se ha comprobado que la maspina interacciona con el colágeno I y III, con la fibronectina y laminina, aumentando la actividad integrina, modulando la adhesión celular a la matriz extracelular e impidiendo de esta forma la invasión

tumoral²⁹⁴. Además inhibe la migración celular en ausencia de actividad inhibitoria sobre las proteasas²⁹⁵.

Se piensa que la alteración de la expresión de la maspina en las células neoplásicas podría conferir a las células tumorales la capacidad de invadir, y eventualmente, metastatizar, por lo que se ha convertido en objeto de estudio como potencial marcador de agresividad tumoral.

Maspina y cáncer de próstata

El significado biológico de la maspina en la carcinogénesis prostática aún está por dilucidar. Se ha comprobado que en el epitelio prostático normal, ésta se expresa predominantemente en las células basales y que en el epitelio tumoral su expresión es inversamente proporcional a la de la hepsina²⁹².

7.3. EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS Y SU PAPEL EN LA CARCINOGENÉISIS PROSTÁTICA

El crecimiento normal y la actividad funcional de la glándula prostática requieren el estímulo de los andrógenos. Su producción es regulada por el eje hipotalámico-pituitario-gonadal. La hormona liberadora de gonadotropinas (Gnrh) es liberada por el hipotálamo de forma pulsátil, estimulando la secreción de LH por parte de la adenohipófisis. A su vez, la LH actuará en el ámbito testicular sobre las células de Leydig, que producirán testosterona, que constituye el andrógeno circulante más abundante. La mayor parte se encuentra unida a proteínas (95% a la SHBG, 3% a la albúmina). En la próstata, la testosterona es convertida en Dihidrotestosterona (DHT) por medio de la acción de la 5- α -reductasa tipo 2. Tanto la testosterona como la DHT se unen en el núcleo al receptor de andrógenos (la DHT lo hace de forma más potente), activando la transcripción de los genes regulados por los andrógenos.

Como se ha comentado previamente al inicio de esta introducción, los andrógenos son esenciales para el crecimiento y desarrollo prostático. Desde que Huggings y colaboradores²⁹⁶ establecieron la dependencia androgénica del cáncer de próstata, la terapia de ablación (en sus diferentes modalidades) ha sido uno de los pilares más importantes en el tratamiento de esta enfermedad.

Sin embargo la respuesta a esta ablación no es indefinida, y a lo largo de la evolución muchos de estos tumores se convierten en “resistentes” al bloqueo hormonal. Este fenómeno podría explicarse por la presencia de clones celulares insensibles a la acción androgénica, y que seguirían proliferando sin control a pesar del tratamiento, o por la alteración del receptor de andrógenos²⁹⁷.

El receptor de andrógenos (RA) facilita la regulación de genes implicados en la proliferación y diferenciación prostática. Mutaciones que sean capaces de alterar su estructura, función y regulación pueden favorecer el crecimiento de subpoblaciones celulares dentro del tumor capaces de proliferar incluso en un medio privado de andrógenos²⁹⁸.

El gen que codifica para el RA se encuentra localizado en el cromosoma X en la posición Xq11-12²⁹⁹. Dicho gen codifica una proteína de 919 amino-ácidos y un peso molecular de 98 kDa perteneciente a la superfamilia de receptores esteroideos de localización nuclear³⁰⁰ y que se compone de tres dominios: un dominio de activación transcripcional, otro de unión al DNA y otro de unión a andrógenos situado en la porción C-terminal³⁰¹. Su activación provocará la transcripción de los genes regulados por los andrógenos.

El RA se encuentra presente en el cáncer de próstata tanto primario como metastásico independientemente del grado o estadio, así como en los tumores hormonorefractarios^{302,303}. Su activación en las células prostáticas normales y neoplásicas promueve fenómenos de proliferación y angiogénesis complejos, implicados en la progresión del tumor y eventualmente en el desarrollo de la independencia hormonal.

En resumen, los andrógenos actuando a través del RA, están implicados en la carcinogénesis prostática, comportándose como promotores de la proliferación celular tumoral.

7.4 ANTIGENO Ki-67

Entre las muchas moléculas que intervienen en la regulación del ciclo celular se encuentra la Ki-67. Se trata de una proteína cuyo peso molecular oscila entre 345 y 395 kDa y que es expresada por las células que se encuentran en las fases G1, S, G2 y M

pero no en la fase G0 del ciclo celular. Por ello representa un marcador de actividad proliferativa de las células y su expresión ha sido relacionada con la agresividad biológica de diferentes neoplasias.

La expresión del antígeno Ki-67 en las metástasis hepáticas del cáncer de colon ha resultado tener un valor pronóstico en cuanto a la supervivencia de estos enfermos³⁰⁴. También se ha comprobado su utilidad como marcador pronóstico en el cáncer colorrectal en estadio C de Dukes³⁰⁵.

En cuanto al cáncer de próstata se refiere, se ha comprobado la utilidad de la expresión de Ki-67 en las muestras de biopsias prooperatorias para predecir un eventual fracaso bioquímico tras la prostatectomía radical^{306,307} y se ha asociado a la supervivencia libre de progresión en enfermos sometidos a dicha intervención³⁰⁸.

8. RESUMEN

El cáncer de próstata supone un gran porcentaje de los tumores malignos diagnosticados en el ser humano, constituyendo junto a los tumores de pulmón y colon, las tres causas más frecuentes de mortalidad por cáncer en varones. A pesar de los continuos avances en el diagnóstico y tratamiento aún resulta difícil el discernir entre los tumores silentes y aquellos que se van a comportar de forma agresiva, por lo que se hace interesante el estudio de marcadores que nos permitan predecir la evolución de esta enfermedad.

La progresión del carcinoma de próstata se lleva a cabo a través de estadios, que incluyen la enfermedad preinvasiva, el cáncer invasivo órgano-confinado y la enfermedad metastásica. Durante estos estadios, el proceso invasivo tumoral tiene lugar en unas fases consecutivas, en el que las células han de superar unas barreras tisulares para conseguir su diseminación. Estas barreras corresponden en gran parte a la matriz extracelular (MEC) y formas particulares de la misma, como las membranas basales, que han de ser atravesadas para que las células malignas abandonen el compartimento neoplásico y viajen por el estroma intercelular hasta los vasos, penetrando y diseminándose por el sistema circulatorio, y vuelvan a salir a los tejidos tras atravesar la pared vascular. Esto permite deducir que estos elementos invasivos deben contar con unos mecanismos de anclaje a la MEC, su degradación y la progresión a través de ella. Estos mecanismos se basan en la existencia de moléculas de adhesión para elementos de la MEC y sistemas enzimáticos que la degraden.

La expresión de proteasas constituye uno de los mecanismos que confieren capacidad invasiva a las células tumorales, al permitir la disolución de la MEC. Las catepsinas, proteinasas cisteínicas lisosomales, de las que se han descrito varios tipos hasta la fecha, debido a su capacidad de degradar la MEC y conferir ese fenotipo invasivo a diferentes neoplasias humanas, se han constituido en objeto interesante de estudio, por sus más que probables implicaciones pronósticas.

La identificación y caracterización de nuevas proteasas son constantes, y su estudio se hace indispensable para entender la capacidad invasora de las neoplasias. De reciente descubrimiento son la hepsina y maspina.

El estudio de estas proteasas, junto con otras moléculas implicadas en la progresión e invasión del cáncer de próstata y su posible relación con los parámetros clínico-patológicos de esta enfermedad puede aportar mayor conocimiento sobre la biología de este tumor.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Basándonos en estudios previos realizados en otros modelos tumorales, en los que se han demostrado la presencia de proteasas relacionadas con los mecanismos de invasión, progresión y metástasis, planteamos como hipótesis de trabajo que *en la progresión del carcinoma prostático, desde las lesiones preinvasivas hasta la fase metastásica, intervienen distintas proteasas, encargadas de facilitar la invasión de la matriz extracelular. La expresión de algunas de estas proteasas puede además ser útil como factor pronóstico de la evolución del carcinoma de próstata.*

Para comprobar experimentalmente esta hipótesis se pretenden alcanzar los siguientes objetivos:

- 1) Evaluar la expresión de proteasas Catepsinas B y L, Hepsina y Maspina, así como la expresión de marcadores relevantes, como el receptor de andrógenos y el antígeno Ki-67, en los diferentes estadios de progresión del carcinoma prostático (tejido normal, PIN Alto grado, carcinoma invasivo)
- 2) Correlacionar la expresión de dichas proteasas con parámetros clínico-patológicos (PSA sérico previo al tratamiento, Grado de Gleason, estadio patológico, progresión...)
- 3) Establecer las posibles utilidades diagnósticas y clínicas de la determinación de la expresión de dichas proteasas en el carcinoma de próstata, y su valor como marcadores pronósticos de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE LOS CASOS

Se llevó a cabo la revisión de las historias clínicas correspondientes a 62 pacientes afectados de cáncer de próstata, intervenidos en nuestro centro entre los años 1996 y 2003. Todos ellos presentaron en el momento del diagnóstico un estadio clínico localizado (T1-T2, según la clasificación TNM del año 1997), y por lo tanto sometidos a prostatectomía radical con intención curativa. Se excluyeron de la selección aquellos casos tratados con bloqueo androgénico de forma previa a la intervención quirúrgica, dados las posibles alteraciones genómicas y fenotípicas de este tratamiento sobre las células tumorales, dificultando así su valoración histológica posterior.

Se excluyeron así mismo las variantes histológicas inusuales de carcinomas (mucinosos, células pequeñas, etc.)

De las historias clínicas de cada paciente se recogieron datos de edad, el valor de PSA sérico preoperatorio, el grado de diferenciación de Gleason en las muestras de biopsia, el estadio clínico según la clasificación TNM, y tras la realización de la prostatectomía radical, los datos correspondientes al grado de Gleason definitivo, el estadio patológico de la enfermedad, el estado de los márgenes de resección quirúrgicos, la presencia de infiltración perineural, la instauración de tratamiento complementario y la respuesta al mismo, así como los valores de PSA sérico postoperatorio.

2. SELECCIÓN DE LOS TEJIDOS

El estudio se ha realizado a partir del análisis de 60 muestras compuestas por:

- a) 60 adenocarcinomas, obtenidos de 60 piezas de prostatectomía radical, correspondientes a tumores primarios, intervenidos en el Servicio de Urología del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona.
- b) Tejido prostático normal, Hiperplasia Benigna de próstata y focos de Neoplasia Intraepitelial Prostática de Alto Grado (PIN) adyacentes a las áreas de tumor, así como dos muestras de metástasis ganglionares, fueron también estudiados con propósitos descriptivos.

Todos los casos estudiados fueron diagnosticados e intervenidos en nuestra institución. Las piezas quirúrgicas fueron procesadas e incluidas en parafina para la realización de estudios inmunohistoquímicos, formando parte del banco de tejidos del servicio de Anatomía Patológica.



3. ESTUDIO HISTOLÓGICO

3.1. OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

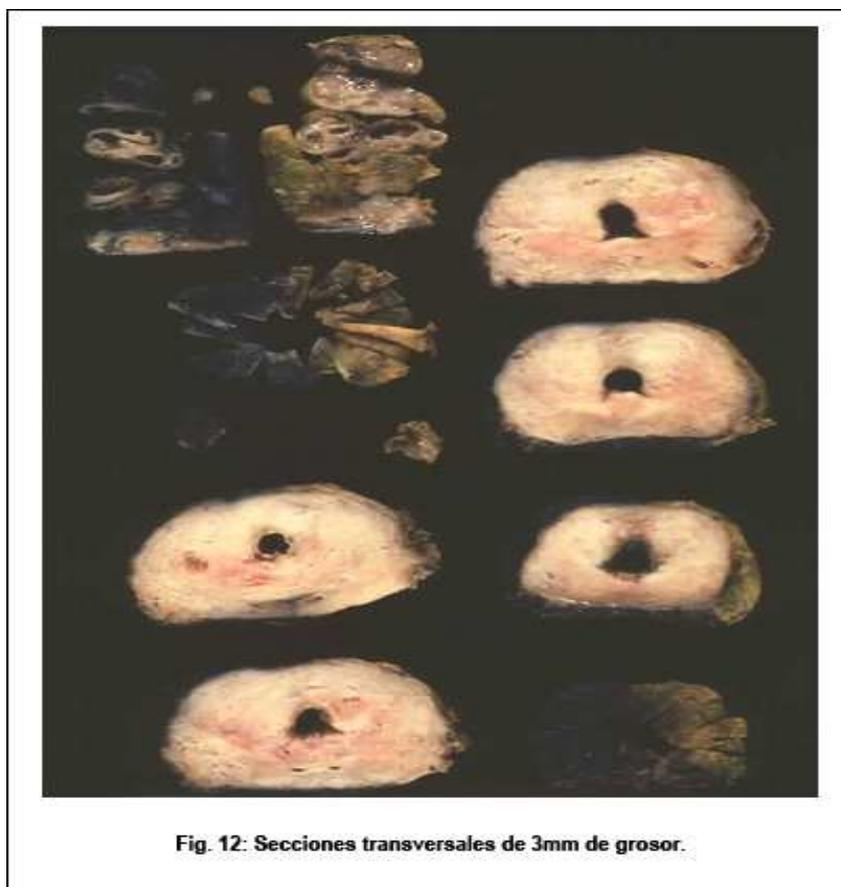
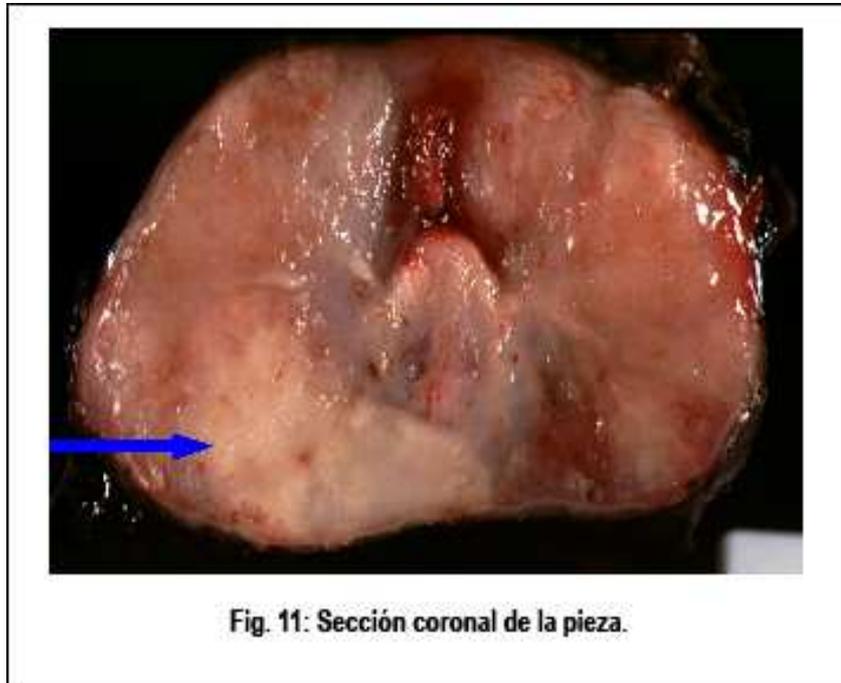
Tras la realización de la prostatectomía radical, la pieza quirúrgica fue enviada al servicio de Anatomía Patológica en fresco, o en formol al 10 % si se preveía algún tipo de demora en el envío.

3.2. ESTUDIO MACROSCÓPICO

3.2.1 Prostatectomía radical (protocolo de tallado)

Las piezas se examinaron para detectar la existencia de nódulos tumorales, posteriormente se pesaron y se midieron. Se orientaron y fijaron durante 24 horas. Se separaron las vesículas seminales y los conductos deferentes, efectuando secciones transversales y señalando inequívocamente el margen de resección de ambos conductos deferentes. Se seccionaron las próstatas transversalmente, realizando cortes de aproximadamente 3 mm de grosor Y se analizaron macroscópicamente (**Fig.11**).

Finalmente, se procedió a la inclusión de los márgenes vesical y apical (uretral distal) obteniendo múltiples secciones radiales de los fragmentos. El resto del tejido prostático se incluyó en su mayor parte con un promedio de 25 bloques (**Fig12**).



3.3. INCLUSIÓN DEL MATERIAL EN BLOQUES DE PARAFINA

El proceso consiste en 12 pasos de una duración total de 17 horas y 15 minutos, realizado de forma totalmente automatizada. Los pasos incluyeron sucesivamente: formol al 10%, etanoles al 70 y 90%, en etanol absoluto, tolueno y parafina.

3.4. OBTENCIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS

Para la obtención de los cortes histológicos se utilizó un microtomo calibrado para realizar secciones del bloque de parafina de 3 μm de grosor. Los cortes se depositaron en un portaobjetos de vidrio, quedando las preparaciones listas par su tinción y montaje.

3.5. TINCIÓN Y MONTAJE DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS

Las preparaciones se tiñeron de forma automatizada siguiendo un protocolo que consta de 22 pasos y dura 49 minutos. Los pasos incluyeron sucesivamente desparafinación y rehidratación con xileno, etanol absoluto, etanol 96°C, agua, hematoxilina, agua, agua acética, agua, etanol 96°C, eosina, etanol absoluto, xileno-eucaliptol y xileno.

Al finalizar este proceso, se obtuvo la preparación histológica teñida. Finalmente, para montar las muestras, se añade sobre la preparación DPX y un cubre-objetos.

3.6 ELABORACIÓN DE MATRICES TISULARES

Los grandes avances que se han producido en los últimos años en el campo de la genómica y la bioinformática han derivado en la aparición de técnicas mediante las cuáles se obtienen enormes cantidades de datos que pueden ser procesados y analizados con programas informáticos, hasta obtener unos resultados que difícilmente podían obtenerse en años anteriores. Entre éstas técnicas destacan los cDNA “microarrays” (que pueden traducirse como micromatrices de cDNA) mediante los cuáles se pueden estudiar cambios en la expresión de un gran número de genes a partir de una sola muestra tumoral. Sin embargo, esta técnica, debido a su complejidad y elevado coste, no es adecuada para conocer si estos cambios de expresión observados en un determinado número de genes son habituales en el modelo tumoral estudiado. Es decir, es necesario realizar un cribaje en el ámbito poblacional, mediante el análisis de un

marcador molecular en grandes grupos de tumores. Además, la técnica de microarrays de ADN analiza el estado del ARNm y no el de la proteína codificada por el gen. Para ello, se puede utilizar la técnica de los “tissue microarrays” (TMAs), que pueden traducirse como micromatrices de tejidos, con lo que se realiza el proceso inverso: se estudia el producto de un gen o genes en un gran número de tumores.

La técnica de los “tissue microarrays” es útil para un análisis rápido de marcadores moleculares en un gran número de muestras, utilizando una mínima cantidad de tejido y disminuyendo significativamente los costes. Se considera que esta pequeña porción de tejido aporta información importante sobre la biología del cáncer, también desde un punto de vista clínico, de investigación y epidemiológico. El estudio de un número muy elevado de casos aporta información en el ámbito poblacional que será importante también en el ámbito individual. Además, esta técnica reduce la variabilidad de las tinciones inmunohistoquímicas al estudiar muchos casos a la vez.

En 1998 Kononen y colaboradores³⁰⁹, describieron la técnica de “tissue microarrays”. Para ello, utilizaron un sencillo aparato denominado “tissue arrayer”. Es en este momento en el que se describe una técnica que consistía en pinchar con una aguja de pequeño diámetro un bloque de parafina y extraer un diminuto cilindro de tejido que se colocaba en otro bloque, denominado “receptor”, en el que se disponían matricialmente una gran cantidad de cilindros. Potencialmente, se pueden disponer hasta 1000 cilindros de tejido en un mismo bloque. Además, esta técnica aportaba ventajas adicionales, como su utilización en otras técnicas como el FISH e ISH.

Según la composición de los TMA, se pueden definir diversos tipos de TMA:

- TMAs multitumor:

Están compuestos por distintos tipos tumorales. Se utilizan para cribar alteraciones moleculares de interés.

- TMAs de progresión:

Se usan para el estudio de alteraciones moleculares en distintas etapas de un tumor en particular (ej: cáncer de mama, vejiga urinaria, riñón y próstata). Un ejemplo es el de un estudio de la progresión del cáncer de

próstata que incluya tejido normal o hiperplásico, PIN, carcinoma localizado, carcinoma localmente avanzado, metástasis y recidivas.

- TMAs de pronóstico:

Constituidos por tumores de los que se poseen datos clínicos y seguimiento. Con la ayuda de estos arrays, nuevos parámetros pronósticos podrían ser identificados o se puede probar el valor de alteraciones moleculares para predecir la respuesta a la quimioterapia.

3.6.1 Utilidades de las matrices de tejido

Con el estudio de marcadores utilizando técnicas de inmunohistoquímica, hibridación in situ y FISH, esta técnica se considera adecuada para:

- Estudio de la progresión tumoral
- Cribaje de todo el espectro de una neoplasia
- Cribaje de nuevos marcadores en diferentes tejidos y tumores.
- Ensayos clínicos
 - o Establecimiento de perfiles moleculares de tumores
 - o Validación de los datos de cribaje de los cDNA microarrays y otras técnicas parecidas
- Probar y optimizar sondas y anticuerpos
- Docencia y control de calidad a fin de mejorar la interpretación estandarizada de resultados
- Obtención de una muestra para extraer ADN.

3.6.2 Ventajas e inconvenientes del uso de las matrices de tejido

La principal ventaja de la utilización de esta técnica es la reducción significativa de tiempo y coste para su realización. Es posible efectuar un estudio de grandes series de pacientes en poco tiempo. Ello se halla motivado por la posibilidad de análisis simultáneo

y estandarizado de múltiples muestras y la existencia de un área de tamaño suficiente para analizar.

Los TMAs permiten analizar la expresión del marcador determinado, estudios clínico-patológicos en los que se valora la expresión de este marcador con otras variables como tipo histológico, grado, TNM... También se pueden realizar trabajos cuya finalidad sea la obtención de factores pronósticos, mediante estudios de supervivencia, aparición de recidivas, etc.

Los principales inconvenientes surgen en los casos de tumores muy heterogéneos histológicamente y cuando existe un mínimo número de células tumorales en las biopsias. La reproducibilidad de los resultados debería validarse mediante un estudio comparativo con secciones completas de un grupo de tumores de este tipo.

3.6.3 Construcción de las matrices

Los TMAs no se construyen de forma aleatoria, sino seleccionando determinadas regiones del tumor. En los casos de tumores muy heterogéneos, una cuidada selección de las zonas puede aumentar la representatividad de los resultados. En el caso de expresarse de forma heterogénea, la evaluación debe ser más cuidadosa. Por otra parte, se contraindica el estudio con TMAs de los marcadores de expresión focal, ya que puede dar lugar a una interpretación errónea. En este caso, una alternativa sería la utilización de técnicas que requieran de un mayor aporte de material, como los "microchops"³¹⁰.

A pesar de sus grandes ventajas, es necesario comentar que los TMAs son una herramienta de cribaje en el ámbito poblacional, para analizar de un modo rápido y económico las frecuencias de expresión de marcadores en poblaciones celulares, tisulares o en pacientes utilizando un gran número de casos, pero el estudio cuidadoso y exacto de un tumor requiere de múltiples secciones completas amplias y consecutivas.

Para la elaboración de nuestras matrices tisulares se empleó el Tissue Arrayer (Beecher Instruments® **Fig.13**). Es un sencillo instrumento que consta de una lámina base, un receptáculo portabloques para el bloque receptor del array, un puente para el bloque donante, 2 agujas de diferentes medidas en un soporte basculante en dos ejes y una guía de precisión XY.

a) Protocolo de elaboración:

Recogida de bloques donantes y preparaciones histológicas:

1. La construcción del TMA se debe iniciar con la recogida de la información necesaria referente a los casos requeridos para la confección del array, de la base de datos correspondiente o de la historia clínica.
2. Se preparan los bloques -donantes- de parafina, con un mínimo aconsejado de 3 mm de profundidad tisular y con una adecuada preservación antigénica durante el proceso de fijación.
3. Es aconsejable disponer de una preparación nueva teñida con hematoxilina-eosina como guía para seleccionar las regiones que deseamos seleccionar.
4. Con ayuda del microscopio óptico, se marca con un rotulador el punto exacto correspondiente a la zona elegida.
5. Posteriormente se enfrenta la preparación histológica con el bloque de parafina correspondiente y se marcan las zonas elegidas en el bloque con rotulador.
6. Confeccionar una plantilla, identificando todos los cilindros y su disposición en el array, teniendo en cuenta lo siguiente:
 - Número de casos que se van a utilizar. Aunque teóricamente se pueden introducir hasta 1200 muestras, en la práctica el número de cilindros de cada TMA varía entre 100 y 400, dependiendo del grosor de la aguja (0.6, 1, 2 mm) y el espaciado.
 - Diámetro del cilindro: generalmente se utiliza la aguja de 0,6 ó de 1 mm. Las agujas de diámetro superior (1,5 ó 2 mm) raramente se utilizan en la práctica.
 - Espaciado entre los cilindros: suele ser de 0,8 - 1 mm entre dos muestras adyacentes.

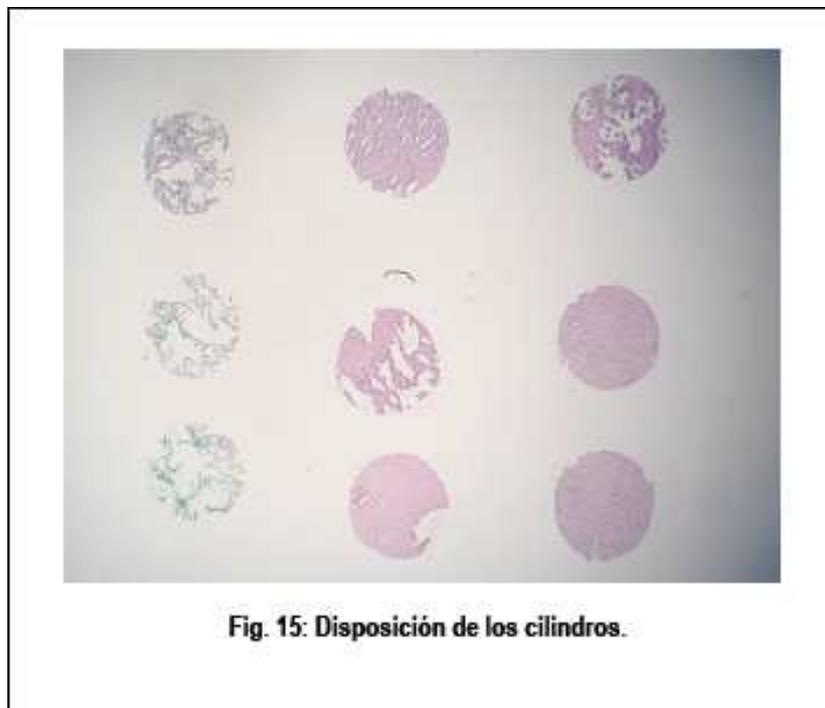
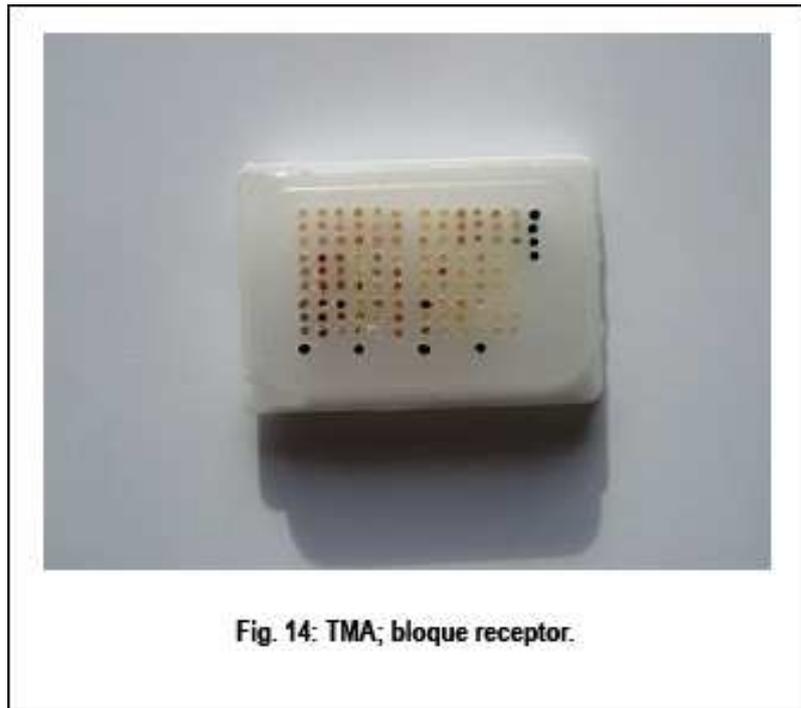
- Margen: se recomienda que sea de 2,5 - 3 mm, para evitar la fragmentación de la parafina.

La matriz de tejidos se construye extrayendo con la aguja receptora cilindros a partir de los bloques donantes e introduciéndolos de forma secuencial y ordenada (matricial) en el bloque receptor.

El bloque (**Fig.14**) se recalienta brevemente a 40° para estabilizar los cilindros.

7. Dejar enfriar el bloque a temperatura ambiente antes de cortar
8. Realizar secciones con el microtomo para teñir con H-E (**Fig.15-16**) o almacenar para su uso en inmunohistoquímica.





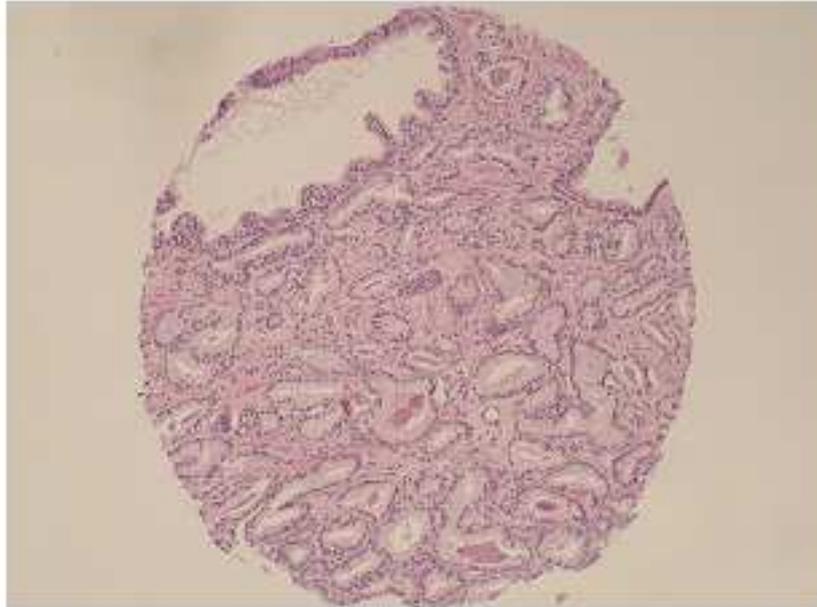


Fig. 16: Detalle de cilindro (Hematoxilina-Eosina)

b) Problemas técnicos

- Rotura del bloque

Uno de los problemas más graves que pueden surgir al manipular el bloque es la rotura del mismo al proceder a cortarlo con el microtomo. La particular composición del TMA, con múltiples cilindros incluidos en parafina motiva que una incorrecta manipulación pueda ocasionar su fragmentación, lo cuál ocasiona prácticamente siempre su inutilización. Es importante ser muy cuidadoso en el momento de efectuar secciones del bloque, ya que no nos encontramos delante de escasos fragmentos de gran tamaño, sino de un gran número de pequeños cilindros que están incluidos en parafina.

- Tinción heterogénea

Se produce en los casos en que algún componente de la técnica inmunohistoquímica no entra en contacto con las muestras. En los casos en que se realizan las técnicas

inmunohistoquímicas de forma automatizada, se debe ser muy cuidadoso cuando las preparaciones se depositan verticalmente en el inmunoteñidor, que puede ocasionar una cierta falta de homogeneidad, al no teñirse las filas más superiores.

- Pérdida de cilindros

Se produce tras efectuar un gran número de cortes en el bloque receptor, en los casos en que se han introducido cilindros de escaso grosor. Es importante seleccionar bloques donantes con el mayor grosor posible (mínimo aconsejable: 3 mm) para poder obtener un cilindro de grosor suficiente. En casos extremos, se puede intentar realizar el cilindro verticalizando el tejido o apilando varios cilindros del mismo caso.

- Ausencia de tinción de algunos cilindros

Suele deberse a un incorrecto procesamiento previo de la muestra. Una excesiva fijación del tejido puede negativizar la expresión de los anticuerpos. Al respecto ha aparecido recientemente un trabajo en el que se ha evaluado como afecta el tiempo de fijación en la calidad de la tinción³¹¹.



Fig. 17: Ausencia de tinción en la periferia del cilindro.

c) Aspectos técnicos de TMA en el presente estudio

Siguiendo el método de elaboración expuesto con anterioridad, para la realización de este estudio se construyeron dos matrices tisulares. Los cilindros fueron extraídos del bloque mediante una aguja de 1 mm de diámetro. Cada caso fue representado por duplicado, es decir, por cada tumor se extrajeron dos muestras, con el fin de mejorar su representatividad y paliar la pérdida de cilindros y los efectos de posibles artefactos (tinción heterogénea, “en donut” –Fig.17-, agotamiento de la lesión...)

De la misma forma, en ambas matrices se introdujeron cilindros correspondientes a tejido prostático normal, hiperplasia adenomomatosa de próstata, hiperplasia de células basales, PIN de alto grado, vesículas seminales y metástasis ganglionares, para el estudio descriptivo de los mismos.

3.7 INMUNOHISTOQUÍMICA

Para el estudio de las proteasas se hace necesario el empleo de técnicas de inmunohistoquímica debido sobre todo a la presencia abundante de macrófagos tanto en los tejidos normales como en los neoplásicos, en los que otras técnicas moleculares como los extractos de inmunoblot, northern blot o RT-PCR podrían estar contaminados por sus productos no tumorales.

3.7.1 Anticuerpos

A continuación se detallan los anticuerpos empleados en el estudio inmunohistoquímico. Todos a excepción de la hepsina, se encuentran comercializados y por lo tanto han sido suministrados directamente por el fabricante. En el caso de la hepsina, el anticuerpo fue amablemente proporcionado por el Profesor Timothy Thomson (CSIC, IBM de Barcelona).

	C B	C L	Maspina	Hepsina	K67	Receptor androge.
Anticuerpo	CatHBP5	NCL-CATH-L	550839		MIB1	
Casa comercial	KRKA Eslovenia	Novocastra (UK)	Pharmigen	Dr. Thomson	Immunotech	DAKO
Tipo (mono/polyclonal)	poli	Mono	M o n o	Poli, affinity-purified	mono	mono
Dilución	1/100	1/50	1/200	1/800	1/400	1/50
Desenmascaram.	O/E	O/E	O / E	O/E	O/C	O/E

O/E: olla EDTA O/C: olla Citrato

3.7.2 Técnica de Inmunohistoquímica

La técnica empleada para el estudio es la de Envisión/Peroxidasa. A continuación se expone el protocolo de dicho método:

PASO	ACCIÓN
1	Obtención de cortes que se dejan en estufa a 37 °C toda la noche
2	Desparafinación y rehidratación: <i>Xileno 10 min, xileno 5 min, etanol absoluto 5 min, etanol absoluto 5 min, etanol 96° 5 min, etanol 96° 5 min. Posteriormente rehidratar con agua bidestilada un mínimo de 5 minutos y después dejar en PBS hasta el desenmascaramiento.</i>

3	<p>Desenmascaramiento antigénico:</p> <p>Mediante un pre-tratamiento calentando en olla a presión durante 5 min en 2000 ml de una solución tamponada de citrato sódico DAKO ChemMate 10 mmol/l (DAKO, Glostrup, DK). Se deja reposar durante 15 minutos.</p> <p>Posteriormente, dejar en PBS hasta la incubación.</p>
4	<p>Incubación con anticuerpos primarios:</p> <p>Previamente, diluir el anticuerpo primario en el Antibody Diluent por Dako ChemMate (**).</p> <p>Incubación de las secciones con el anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizan 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.</p>
5	<p>Inhibición de la peroxidasa endógena</p> <p>Con 3 gotas de la Peroxidase Blocking Solution (DAKO Envision Kit, botella 1) durante 7 minutos. Posteriormente, se realizan 2 lavados de PBS de 5 minutos cada uno.</p>
6	<p>Incubación con el método Envision+</p> <p>Con 3 gotas del Labelled Polymer (DAKO Envision Kit, botella 2) durante 30 minutos. Posteriormente, se realizan 2 lavados de PBS de 5 minutos cada uno.</p>
7	<p>Revelado con una solución de diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno (***), preparada antes del revelado:</p> <p>Se revela según el siguiente protocolo:</p> <p>Solución de revelado 2 min 30, PBS 5 min, Posteriormente, se realizan 2 lavados con agua corriente de 5 minutos cada uno.</p>

8	<p>Contrastar con hematoxilina de Gill (Merck) durante unos 20 segundos y lavar con agua. Seguidamente, pasar por agua acética 20 segundos y lavar con agua.</p>
9	<p>Deshidratar utilizando el siguiente protocolo: Etanol 50°, Etanol 96°, Etanol 96°, Etanol absoluto, Etanol absoluto, Xileno, Xileno, Xileno. Duración total del protocolo: 5 minutos. Seguidamente, montar con DPX (Sigma).</p>

(*) Solución de trabajo:

- DAB (300 μ l)
- Peróxido de hidrógeno al 3% (300 μ l)
- PBS (5 ml)

Conservar a -20°C.

(**) Composición del Antibody Diluent por Dako ChemMate:

Tris Buffer pH 7.2, que contiene 15 mmol/l de NaN_3 y proteína.

Conservar en la nevera.

(***) Solución de trabajo:

- DAB + cromógeno (DAKO Envision Kit, botella 3b)
- Tampón (DAKO Envision Kit, botella 3a)

Preparar con 1 gota de DAB + cromógeno por cada 1 ml de tampón.

Guardar en la nevera hasta usar.

3.7.3 Controles

Paralelamente, se utilizaron controles positivos y negativos para descartar cualquier expresión no específica del anticuerpo primario. En el caso de la catepsina B, el control positivo fueron casos comprobados de expresión de la proteína en carcinomas de colon, mientras que para la catepsina L fueron muestras de hepatocitos con expresión demostrada para CL. El control negativo se realizó al sustituir el anticuerpo primario por la fracción IgG del suero de conejo o ratón a la misma concentración y manteniendo las mismas condiciones físicas durante todo el proceso. Los macrófagos intraprostáticos sirvieron como control positivo interno.

En el caso de la hepsina y maspina se conocía su positividad en la próstata por lo que se consideró innecesario la inclusión de controles positivos. Los controles negativos fueron similares a los empleados para las catepsinas.

4. VALORACIÓN

La expresión de las proteasas fue valorada en el compartimento epitelial y en el estroma. Como se comentará más adelante, dentro del compartimento epitelial, algunas proteasas presentaron un patrón de expresión citoplasmático, mientras que en otras se observó positividad nuclear. En ambos casos la valoración de la expresión se realizó mediante la proporción de células con tinción positiva observada en los dos cilindros correspondientes a cada caso a gran aumento (x400). De la misma forma se realizó la valoración semicuantitativa de la intensidad de la tinción, estableciendo una escala que comprendía los valores 1 (intensidad débil), 2 (intensidad moderada) y 3 (intensidad fuerte). La ausencia de tinción se evaluó como caso negativo. Con el fin de cuantificar esta expresión en el epitelio se estableció la razón (% de células x intensidad)/10. El punto de corte para considerar los casos positivos como sobrepresados quedó establecido en >12.

En el compartimento estromal la valoración se realizó mediante el recuento de todas las células positivas identificando el área del cilindro con el mayor número de ellas (*“hot spot”*) a gran aumento (x 400). La ausencia de expresión se valoró como caso negativo. La sobreexpresión se determinó con > 5 células positivas en el *“hot spot”*.

Las variables experimentales fueron definidas como cualitativas dicotómicas (sobrexpresión/No sobrexpresión).

4.1 DEFINICIÓN DE VARIABLES DE LOS PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

VARIABLE	CARACTERÍSTICAS
Edad	<ul style="list-style-type: none"> - Variable cuantitativa discreta, en el momento de la recogida de los datos.
Grado Histológico	<ul style="list-style-type: none"> - Se utiliza el sistema de gradación de Gleason combinado - Variable cuantitativa discreta, en el momento de la recogida de los datos. - Variable cualitativa dicotómica con el punto de corte en 7, en diversas pruebas estadísticas. <p style="text-align: center;">Este valor es el considerado óptimo para discriminar, los tumores en “bajo grado” y “alto grado”.</p>

<p>Estadio Tumoral (T)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Se utiliza el sistema recomendado por la American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), mediante la clasificación TNM (5ª edición, 1997). - Casos correspondientes a tumores primarios localizados (pT2) o localmente avanzados (pT3 o superior). - Variable cualitativa dicotómica. Las categorías corresponden a estadios agrupados en localizado y localmente avanzado..
<p>Margen de Resección</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Se considera margen positivo cuando se observan células cancerosas en contacto con la tinta con la que se delimita el margen de resección durante el procesamiento de la pieza. - Variable cualitativa dicotómica. Una categoría contiene las muestras con margen libre y la otra las de márgenes afectados.
<p>Invasión Perineural</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Se considera "invasión perineural" a la presencia de células tumorales en una localización perineural circunferencial o intraneural, tanto intraprostática como extraprostática. - Variable cualitativa dicotómica. Las categorías corresponden a la ausencia o presencia de invasión perineural.

<p>PSA Preoperatorio</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Se consideró la última determinación sérica del PSA antes de la intervención.. - Variable cuantitativa continua, en el momento de la recogida de los datos.
<p>Recidiva del PSA</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Se consideró recidiva cuando los niveles de PSA aumentaron por encima de 0,4 ng/ml en dos determinaciones consecutivas durante el periodo de seguimiento tras la prostatectomía radical. - Variable cualitativa dicotómica. Las categorías corresponden a la ausencia o presencia de recidiva.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El estudio estadístico se llevó a cabo con los programas SPSS® 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y GRAPHPAD PRISM® 4 (Graphpad Software Inc.) a partir de las observaciones y datos clínico-patológicos previamente introducidos en una base de datos diseñada con el programa Excel 2000 del paquete informático Microsoft Office® 2000 (Microsoft Corp.). Los resultados se consideraron significativos con un riesgo alfa inferior a 0,05.

La comparación de variables cualitativas dicotómicas se realizó aplicando la prueba del Chi cuadrado. Cuando las condiciones de aplicabilidad para este test no se cumplían, se recurrió a la prueba exacta de Fisher.

Con el fin de comparar 2 categorías correspondientes a una variable cualitativa con relación a una variable cuantitativa, se empleó la prueba de comparación de medianas t de Student-Fisher para datos independientes. En los casos en los que las condiciones de aplicación no se cumplieron, se recurrió a la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney.

Con el objeto de estudiar la relación entre las variables a estudio y la progresión de la enfermedad, y su posible utilidad clínica como valor predictivo, hemos utilizado el análisis de la supervivencia de Kaplan-Meier y el modelo de riesgos proporcionales de Cox.

Como paso previo al estudio multivariante consideramos oportuno el realizar un primer análisis de la supervivencia univariante, con el fin de evaluar la significación de las distintas variables y determinar cuáles pueden ser introducidas en el modelo predictivo final.

Para las variables categóricas hemos aplicado la prueba de Cox-Mantel (Log-rank Test), con el objetivo de comparar las curvas de supervivencia para una variable (sobrexpresión/No sobrexpresión). Este método es considerado de gran potencia a la hora de detectar diferencias tardías en las funciones de supervivencia³¹². Para la variable continua (PSA) se ha utilizado la regresión proporcional de Cox.

La variable predictora fue introducida en el modelo siempre que su valor p fuera menor o igual a 0.25. Adoptamos este esquema de selección por que las variables estudiadas podían ser relevantes para el modelo. Si el predictor tiene un valor $p > 0.25$ es muy poco probable que pueda contribuir en la predicción. Es importante no confundir este valor de selección para nuestro modelo predictivo, con el valor de significación de un test estadístico, que en nuestro caso fue establecido para $p < 0.05$.

RESULTADOS

A. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

1.1 EDAD

La edad media de presentación del adenocarcinoma de próstata en nuestra serie es de $64,28 \pm 5,86$ años, con una edad mínima de presentación de 45 años y una máxima de 77 años.

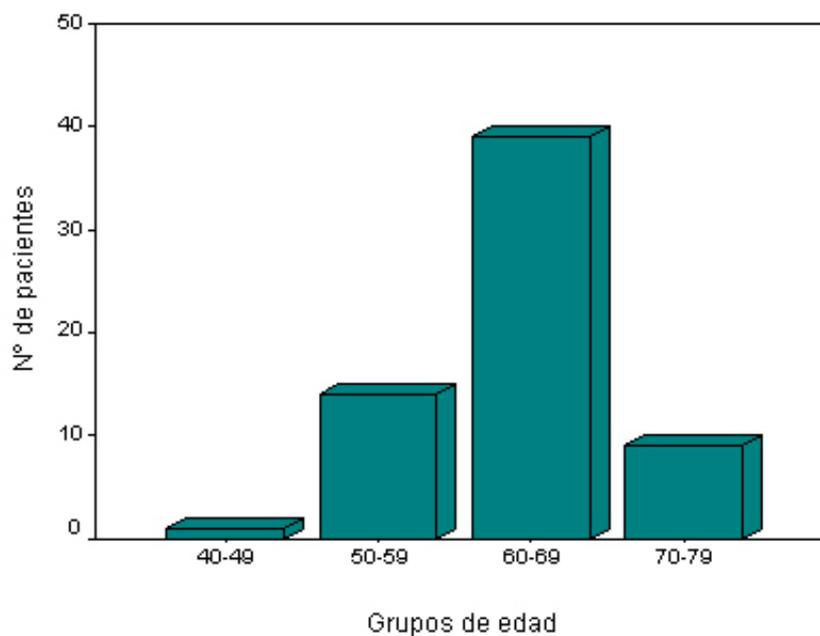


Fig. 18: Distribución por rangos de edad.

La mayor parte de los pacientes (59,1%), presentaron la enfermedad en el rango de edad comprendido entre los 60 y 69 años.

1.2 DETERMINACIÓN DEL PSA

Las determinaciones del antígeno prostático específico fueron realizadas por el Servicio de Bioquímica de nuestro centro mediante la técnica de radioinmunoensayo. Los niveles de PSA aceptados como normales son los comprendidos entre 0 y 4 ng/dl.

El nivel medio de PSA fue de $10,408 \pm 6,442$ con un rango de 0,6 a 31,0 ng/dl. El 55,75% de las determinaciones se encontraron en el rango de 4 a 10 ng/dl.

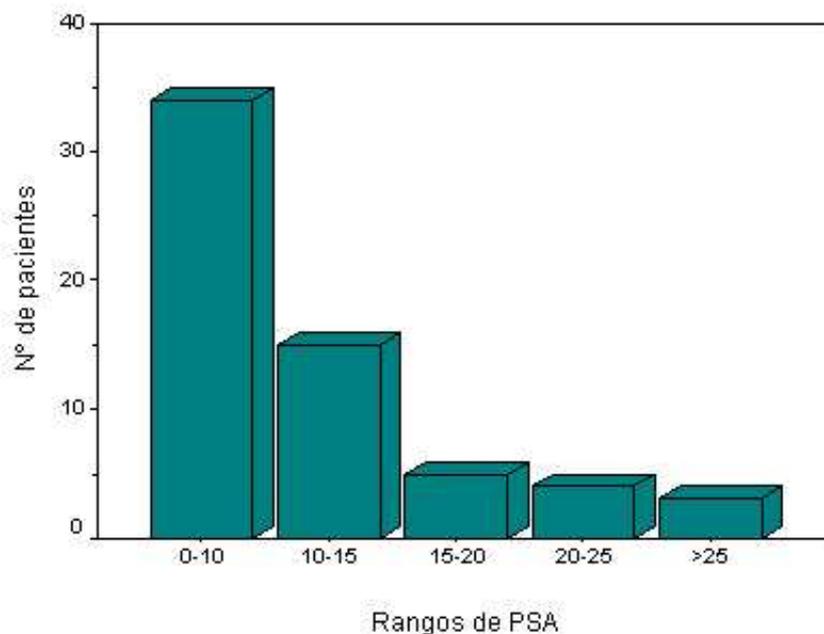


Fig. 19: Distribución por rangos de PSA.

1.3 GRADO DE DIFERENCIACIÓN DE GLEASON

Catalogados los casos como bajo grado de diferenciación (grado de Gleason entre 2 y 6) y alto grado de diferenciación (grado de Gleason entre 7 y 10), el 37,3 % de los casos correspondieron a bajo grado, mientras el 62,7% correspondieron a alto grado.

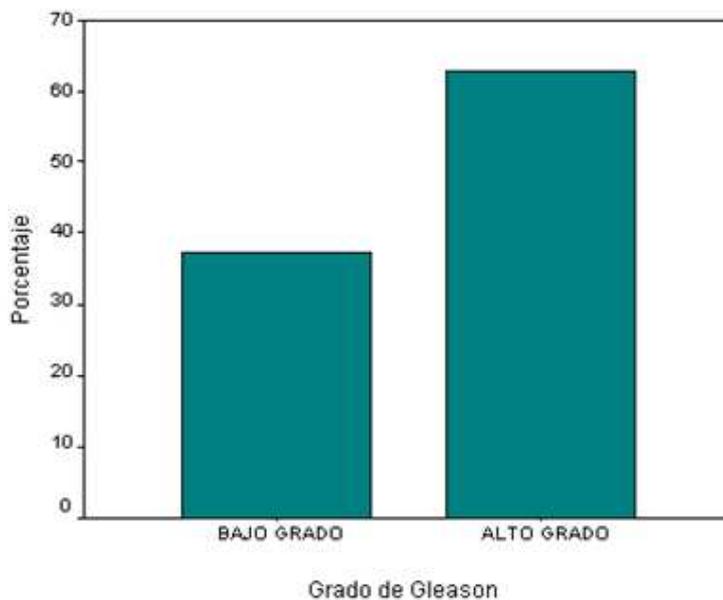


Fig. 20: Distribución por Grado de Gleason.

1.4 ESTADIO PATOLÓGICO

En nuestra serie, 6 casos (10%) correspondieron al estadio patológico T2a, 27 (45%) correspondieron al T2b, 16 (26,7%) T3a, 2 casos (3,3%) correspondieron con T3aN1.

El 10% (6 casos) fueron catalogados como T3b, 3,3% (2 casos) como T4a y el 1,7% (un único caso) como T4bN1. (Tabla II)

Estadio Patológico

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	T4bN1	1	1,7	1,7
	T3aN1	2	3,3	5,0
	T4a	2	3,3	8,3
	T2a	6	10,0	18,3
	T3b	6	10,0	28,3
	T3a	16	26,7	55,0
	T2b	27	45,0	100,0
	Total	60	100,0	100,0

Tabla II: Frecuencia por estadio

Como se ha comentado anteriormente, los casos se agruparon dependiendo de si la enfermedad se encontraba confinada en la glándula (estadios pT2a y pT2b) o bien localmente avanzada (pT3a-b, pT4a-b, y N1).

De esta forma, los tumores órgano-confinados correspondieron al 53,2%, mientras que los localmente avanzados correspondieron al 46,8%.

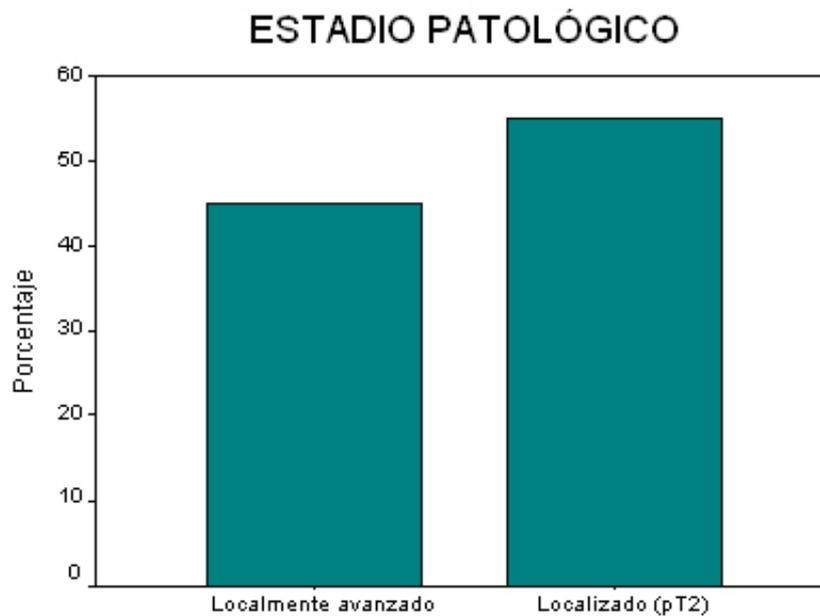


Fig. 21: Distribución por estadio patológico.

1.5 MARGEN QUIRÚRGICOS E INFILTRACIÓN PERINEURAL

De los casos en los que pudo estudiarse esta relación, en 34 (56.7%) los márgenes de resección de la pieza quirúrgica se encontraban afectados, mientras que en 26 (43.3%), dichos márgenes fueron negativos.

La infiltración perineural pudo identificarse en 26 (66.6%) de los 39 casos en los que se evaluó.

1.6 PROGRESIÓN

La progresión de la enfermedad, entendida como el incremento progresivo de los valores de PSA durante el período de seguimiento (seguimiento medio de 22,9 meses, mediana 11,97 rango 1-74,3 meses), se observó en 15 casos (25%). Por el contrario, 45 pacientes (75%) no presentaron recidiva bioquímica.

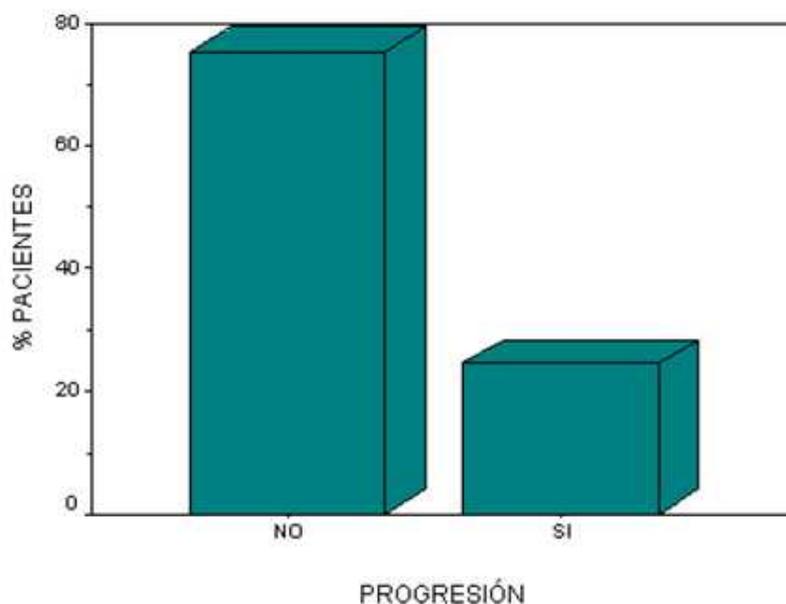


Fig. 22: Distribución por progresión.

2. ESTUDIO ANALÍTICO

Uno de los aspectos más interesantes del estudio de cualquier tipo de neoplasia, es el de correlacionar parámetros clínicos y parámetros patológicos. A continuación se reproducen los resultados que obtuvieron significación estadística o bien, mostraron una cierta tendencia hacia dicha significación. En la tabla III se reproducen los resultados obtenidos en nuestro análisis.

2.1 RELACIÓN PSA PREOPERATORIO Y ESTADIO PATOLÓGICO

Se evaluaron un total de 60 casos. 33 de ellos, correspondientes a estadio tumoral localizado a la glándula prostática (55%), presentaron un valor de PSA preoperatorio medio de 7,996 ng/dl, mientras que en los 27 casos correspondientes a estadio localmente avanzado (45 %), el valor medio de PSA era de 13,35540 ng/dl. Por lo tanto se observa una relación directa entre el nivel de PSA sérico preoperatorio y el estadio patológico (p=0.001).

2.2 RELACIÓN PSA PREOPERATORIO Y PROGRESIÓN

Se estudiaron un total de 60 casos. De ellos, el 75%, (46 casos) no progresaron, siendo su valor medio de PSA preoperatorio de 8,807 ng/dl. Sin embargo los 15 casos (25%) que sí progresaron, presentaron un valor medio de PSA de 15,209 ng/dl. Por lo tanto se observa una relación directa entre un mayor valor de PSA preoperatorio y la progresión de la enfermedad (p=0,007).

2.3 RELACIÓN PSA Y MÁRGENES QUIRÚRGICOS

Se evaluaron 60 casos. De ellos, 26 casos (43,3%) presentaron márgenes quirúrgicos negativos y en 34 casos (56,7%) se detectó presencia de enfermedad en los márgenes de resección. El valor medio de PSA para ambos grupos fue de 8,772 ng/dl y de 11,658 ng/dl, respectivamente. Se observa una asociación directa entre el PSA preoperatorio y la presencia de márgenes quirúrgicos positivos en la pieza de prostatectomía, dicha asociación mostró una tendencia hacia la significación estadística (p=0.068).

2.4 RELACIÓN ENTRE GRADO DE GLEASON Y PROGRESIÓN

Se evaluaron 60 casos, de los que en 15 (25%) se detectó recidiva bioquímica durante el período de seguimiento, mientras que 45 (754%) no presentaron progresión de la enfermedad. De entre los que progresaron, 9 (60%) presentaban un grado de diferenciación alto, y 6 (40%) correspondían a un grado bajo de Gleason. Por lo tanto se

observa una relación directa entre el grado de diferenciación de Gleason y la progresión de la enfermedad (p=0.05).

2.5 RELACIÓN ENTRE ESTADIO PATOLÓGICO E INVASIÓN PERINEURAL

Esta relación pudo evaluarse en 41 casos, de los que 16 (39,0%) presentaban un estadio patológico avanzado y 25 (61,0%) presentaban un estadio localizado. De entre los localmente avanzados, 15 (93,8%) presentaban invasión perineural, mientras que sólo un caso (6,2%) no la presentaba. Se observa una asociación directa entre el estadio patológico y la infiltración perineural (p=0.005).

2.6 RELACIÓN ENTRE MÁRGENES QUIRÚRGICOS Y PROGRESIÓN

Se evaluaron 41 casos de los cuales 33 (80,5%) no progresaron y 8 (19,5%) sí lo hicieron. De estos últimos, 6 (75%) tenían los márgenes de resección afectados por la enfermedad, mientras que en 2 (25%) el estado de los márgenes de resección fue negativo. Se observa una asociación directa entre la positividad de los márgenes quirúrgicos y la progresión de la enfermedad (p=0,048).

	PSA	Gleason	Estadio	IPN	M status	Progresión
PSA	-----		0,003	NS	NS	0,027
Gleason	NS	-----	NS	NS	NS	0,05
Estadio	0,003	NS	-----	0,05	NS	NS
IPN	NS	NS	0,05	-----	NS	NS
M status	NS	NS	NS	NS	-----	0,048
Progresión	0,027	0,05	NS	NS	0,048	-----

Tabla III: Resumen del análisis de los parámetros clínico-patológicos. Valores de p para un nivel de significación de p<0,05. IPN: invasión perineural. M status: Margen status.

B. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

1. EXPRESIÓN DE CATEPSINA B

1.1 TEJIDO PROSTÁTICO NORMAL

El epitelio luminal de las glándulas protáticas normales presentó en general escasa positividad para Catepsina B, sin embargo sí que se observó positividad luminal en las glándulas atróficas o en aquellas próximas a zonas de inflamación. La positividad más intensa en las glándulas normales e hiperplásicas se localizó en la capa de células basales, donde en una escala de intensidad entre 1 y 3, la mayoría de los casos puntuaron como intensidad 3.

La positividad apreciada en el epitelio luminal generalmente presentaba una tinción de densidad granular fina y de intensidad grado 1.

Histiocitos intraglandulares fueron intensamente positivos y sirvieron como controles internos de la técnica inmunohistoquímica. De la misma forma, alguna positividad aislada pudo apreciarse en los macrófagos intersticiales(**Fig. 23**).

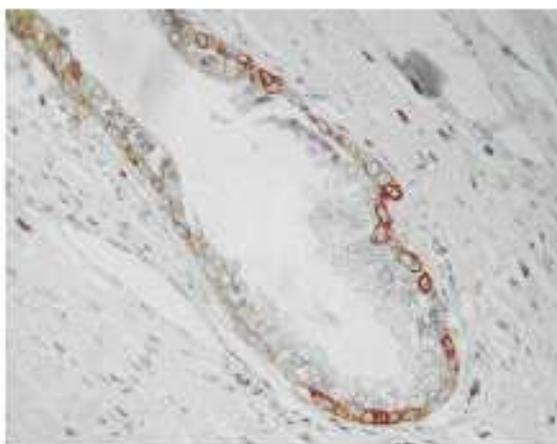


Fig. 23: Células basales positivas para CB. Ausencia de tinción en las células luminales.

1.2 NEOPLASIA INTRAEPITELIAL PROSTÁTICA DE ALTO GRADO (PINAG)

Al contrario de lo que ocurría en el tejido prostático normal, el epitelio luminal de las glándulas afectas de PIN de alto grado, mostraron una intensa positividad granular-vesicular fina, predominantemente de disposición basal. La capa de células basales también fue intensamente positiva (**Fig.24**)

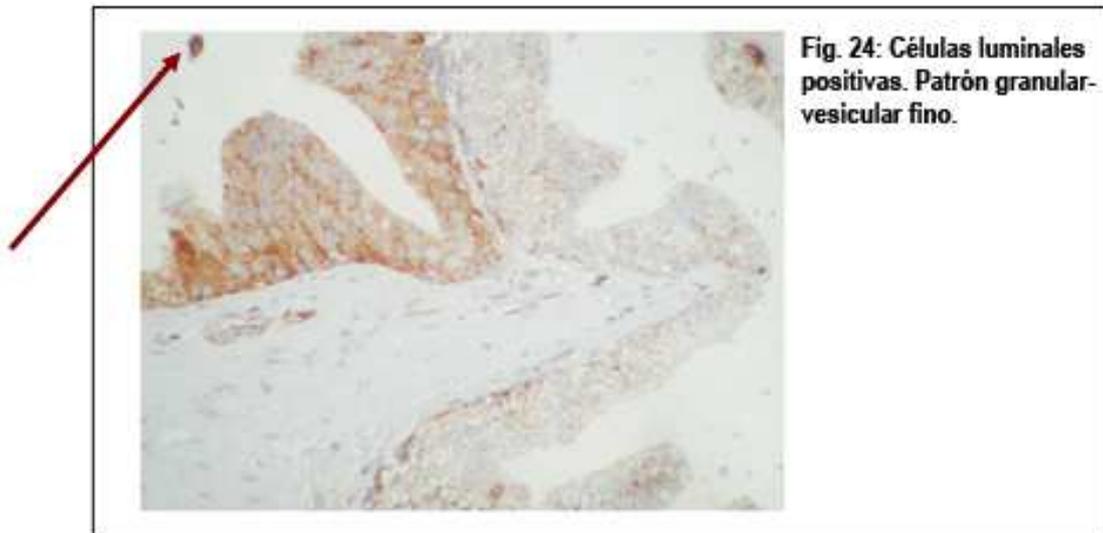
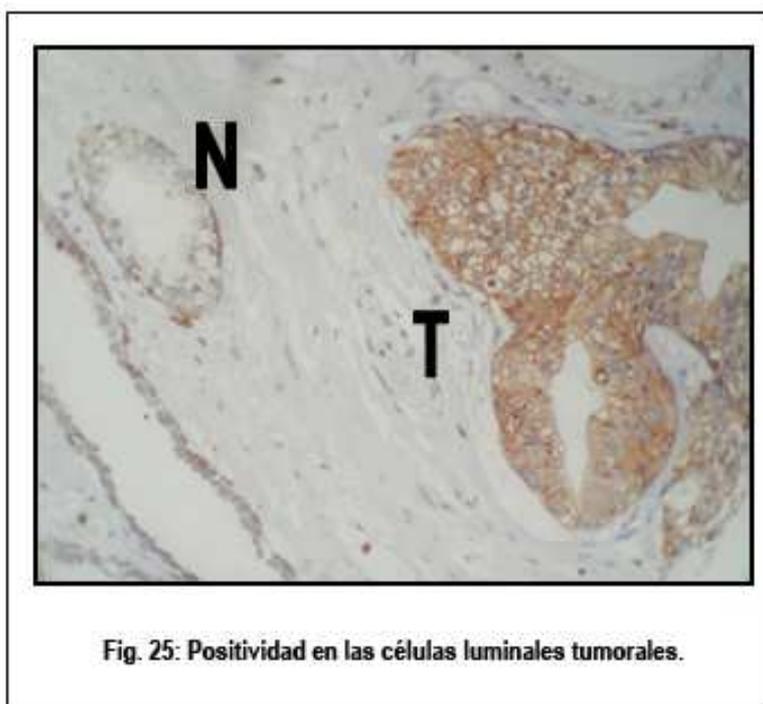


Fig. 24: Células luminales positivas. Patrón granular-vesicular fino.

Macrófago intraglandular [flecha]

1.3 ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA

Positividad epitelial para CB en tejido prostático tumoral fue observada en la práctica totalidad de los casos estudiados. El patrón de expresión predominante fue el citoplasmático, granular-vesicular difuso (**Fig.25**). Al contrario de lo observado en el tejido normal, el tumor presentaba positividad estromal en la gran mayoría de casos de cáncer estudiados (sólo 2 de los 62 estudios fueron CB negativos). Puede decirse que la mayoría de células estromales positivas correspondieron con fibroblastos, y en menor medida con macrófagos del intersticio.



SOBREPRESIÓN DE CATEPSINA B EN TEJIDO TUMORAL

Como se ha comentado en el apartado de material y métodos, la sobreexpresión de catepsina B se evaluó tanto en el compartimento epitelial como en el estromal. Se estudiaron 60 casos, de los cuales 25 (41.7%) mostraron sobreexpresión.

- ***SOBREPRESIÓN EPITELIAL***

A continuación se comentaran las correlaciones observadas en nuestro estudio. Un resumen de las mismas se reproduce en la tabla IV.

a) Sobreexpresión de CB y Grado de Gleason

De los 25 casos que mostraron sobreexpresión, 13 (52.0%) correspondieron a tumores de alto grado y 12 (48.0%), a bajo grado. Aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística, sí pudo observarse una tendencia hacia la significación ($p=0.074$).

b) Sobreexpresión de CB y Ki-67

Se estudiaron 40 casos, de los que 25 (62.5%) mostraron sobreexpresión para Ki-67. De ellos, 7 casos (28.0%) presentaron sobreexpresión de CB mientras que 18 (72.0%) no lo hicieron. Por lo tanto se aprecia una relación inversa estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de Ki-67 y la sobreexpresión de CB (p=0.046).

- **SOBREEXPRESIÓN ESTROMAL**

a) Sobreexpresión de CB y Grado de Gleason

De los 60 casos estudiados 43 (71.6%) presentaron sobreexpresión estromal de CB. 32 de ellos (74.41%) eran tumores de alto grado de Gleason mientras que 11 (25.59%), lo eran de bajo grado. Se aprecia por lo tanto una asociación entre la sobreexpresión estromal de CB y un mayor grado de Gleason, resultando esta asociación estadísticamente significativa(p=0.049).

	<i>Gleason</i>	<i>Estadio</i>	<i>PSA</i>	<i>Receptor</i>	<i>Ki-67</i>
Sobreexpresión CB en epitelio	0.074	NS	NS	NS	0.046
Sobreexpresión CB en estroma	0.049	NS	NS	NS	NS

Tabla IV: Correlación entre la sobreexpresión de CB y parámetros clínico-patológicos

2. EXPRESIÓN DE CATEPSINA L

2.1 *TEJIDO PROSTÁTICO NORMAL*

La expresión de catepsina L (Cat L) en el epitelio prostático normal presentó un patrón similar al observado en la CB. El epitelio luminal mostró una positividad de intensidad 1, siendo más evidente en la capa de células basales. La tinción fue generalmente citoplasmática configurando un patrón predominantemente vesicular apical (las vesículas se dispusieron generalmente entre el núcleo y el polo apical de las células). Curiosamente se apreció positividad nuclear, lo que no había ocurrido en el caso de CB.

De forma esporádica se encontró positividad en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (**Fig.26**).

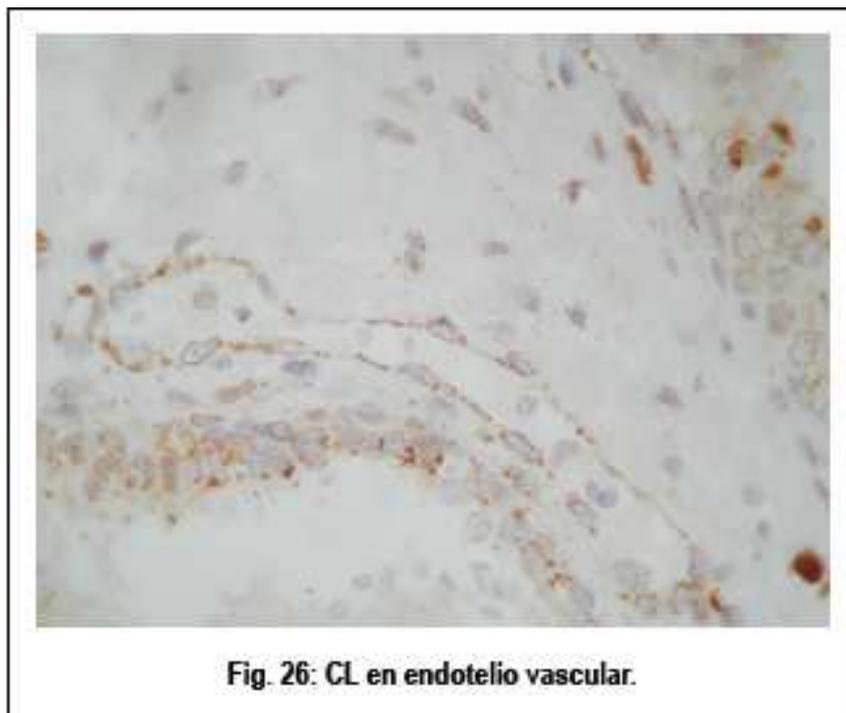
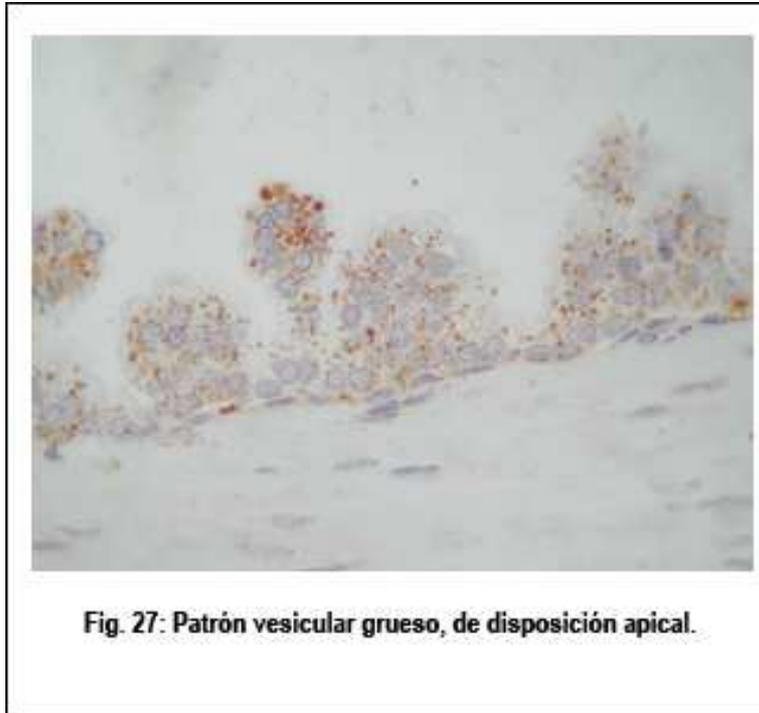


Fig. 26: CL en endotelio vascular.

2.2 *NEOPLASIA INTRAEPITELIAL DE ALTO GRADO (PINAG)*

Las glándulas correspondientes a PIN de alto grado exhibieron una positividad citoplasmática muy marcada (generalmente de intensidad 3) siguiendo un patrón de

vesicular grueso, con las vesículas en disposición apical. La capa de células basales fue de menor intensidad (**Fig.27**).



ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA

Alguna positividad epitelial para CL en el tejido prostático neoplásico fue observada en la practica totalidad de los casos estudiados. El patrón de expresión predominante fue el vesicular apical grueso citoplasmático. También se observó de forma esporádica alguna positividad nuclear (**Fig.28**)

Tal y como ocurría con la catepsina B, el tumor presentó positividad estromal principalmente en los fibroblastos estromales y en menor medida en los macrófagos (**Fig.29**)

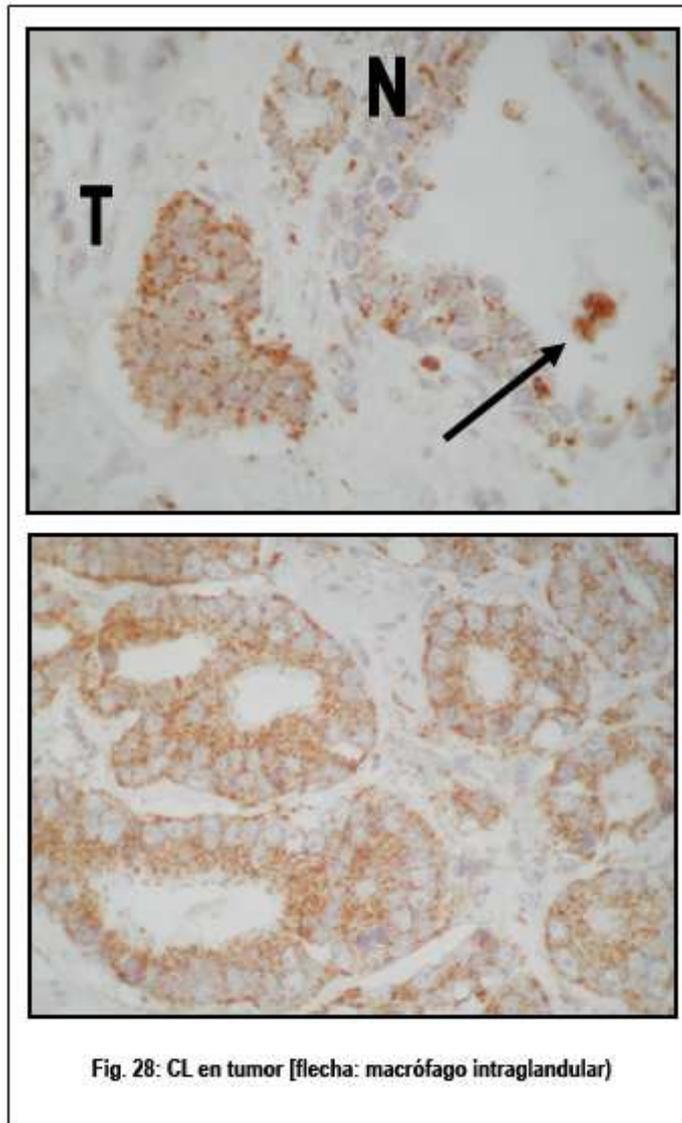
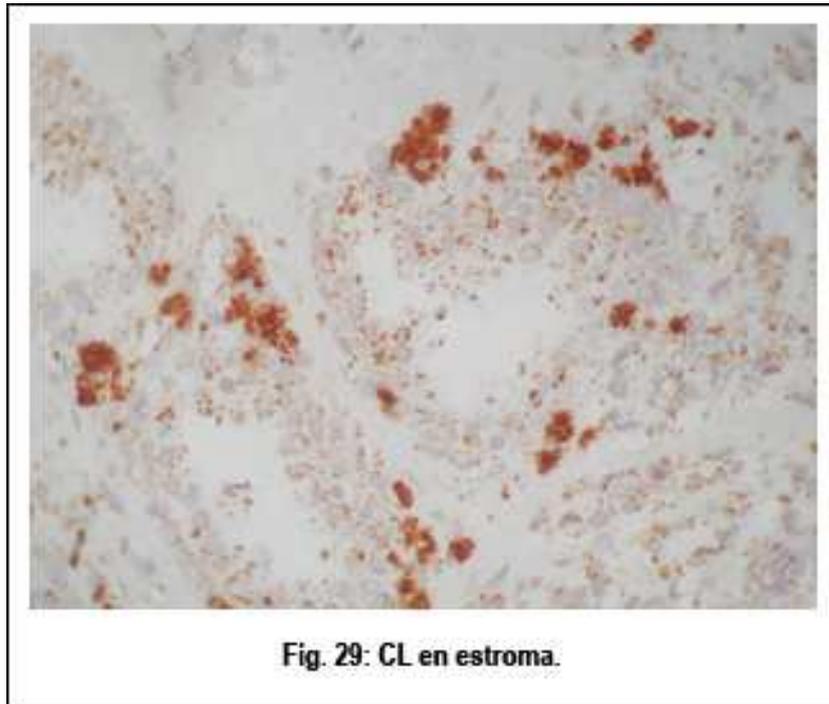


Fig. 28: CL en tumor [flecha: macrófago intraglandular]



SOBREPRESIÓN DE CATEPSINA L EN TEJIDO TUMORAL

- ***SOBREPRESIÓN DE CL EN EPITELIO***

37 casos (67.2%) presentaron sobreexpresión epitelial de Catepsina L, sin embargo, al realizar nuestro análisis no pudieron observarse resultados estadísticamente significativos entre la sobreexpresión de CL en el compartimiento epitelial y los parámetros clínico-patológicos.

- ***SOBREPRESIÓN DE CL EN EL ESTROMA***

Un resumen de las asociaciones halladas entre la sobreexpresión de CL y los parámetros clínico-patológicos puede encontrarse en la tabla V.

a) Sobreexpresión de CL y grado de Gleason

La sobreexpresión de CL en el compartimiento estromal se observó en 18 casos (32.7%), de los 55 estudiados. De ellos 15 (83.3%) correspondieron a tumores de alto grado de diferenciación y 3 (16.7%) a tumores de Gleason bajo. Esta asociación directa entre sobreexpresión estromal y alto grado de Gleason, sin poder asumirse como significativa, sí mostró una tendencia hacia la significación estadística (p=0.066)

b) Sobreexpresión de CL y PSA

El valor de PSA medio en los casos que sobreexpresaron CL en el estroma fue de 13.672 ± 11.596 , mientras que en los casos que no la sobreexpresaron fue de 9.418 ± 6.160 . Se observa una relación directa entre un mayor valor de PSA sérico y la sobreexpresión de CL en el estroma. Esta asociación mostró una tendencia hacia la significación estadística (p=0.08).

	<i>Gleason</i>	<i>Estadio</i>	<i>PSA</i>	<i>Receptor</i>	<i>Ki-67</i>
Sobreexpresión CL en epitelio	NS	NS	NS	NS	NS
Sobreexpresión CL en estroma	0.066	NS	P=0.08	NS	NS

Tabla V: Correlaciones entre la sobreexpresión de CL y parámetros clínico-patológicos.

3. EXPRESIÓN DE HEPSINA

3.1 TEJIDO PROSTÁTICO NORMAL

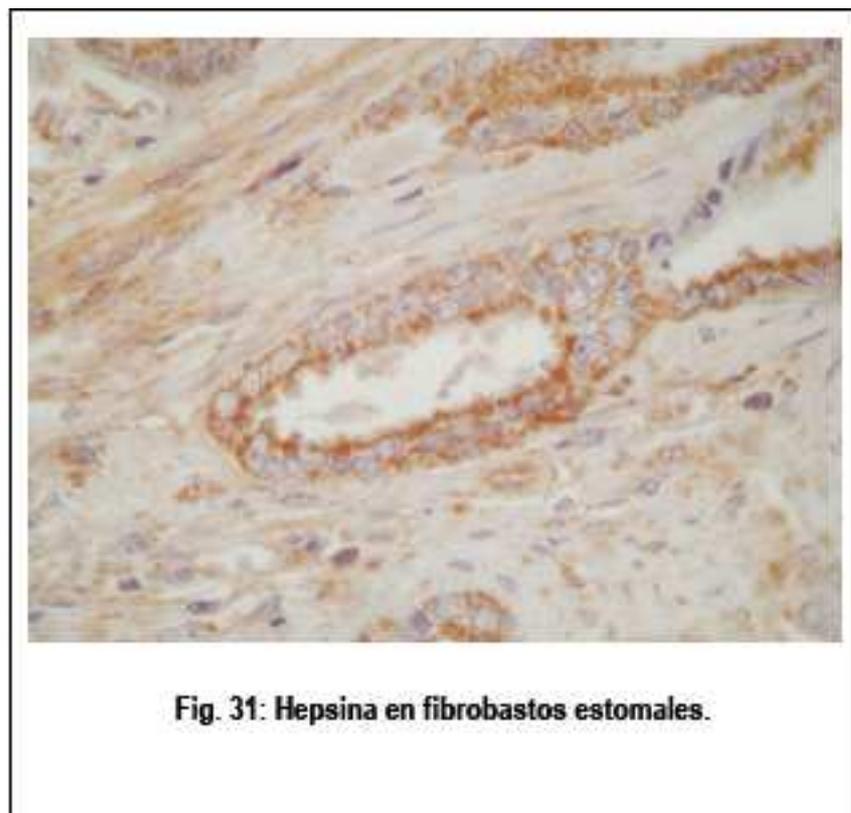
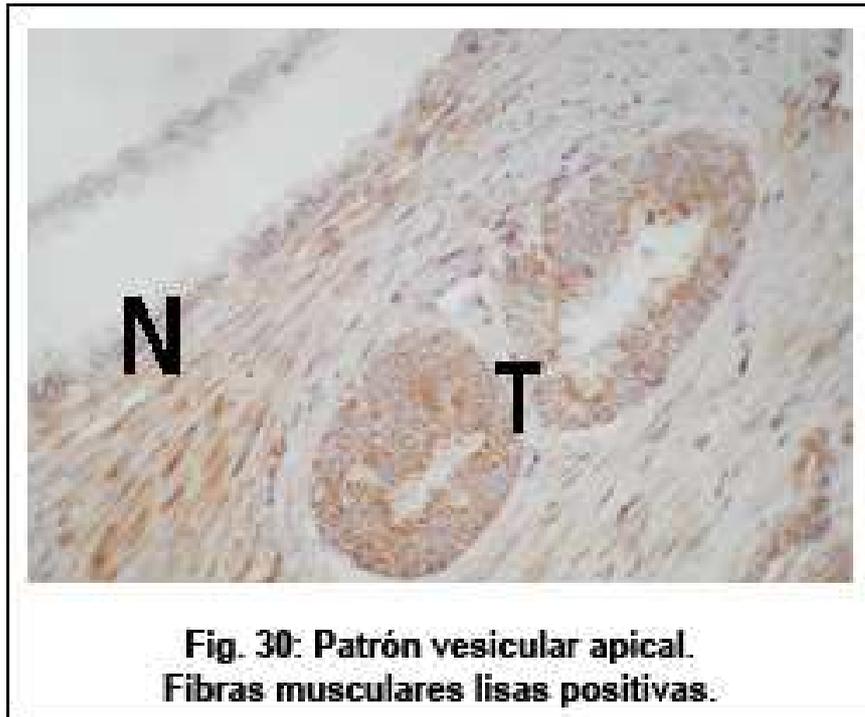
Las glándulas prostáticas normales mostraron una positividad heterogénea para hepsina. En el compartimiento epitelial, las células lumbales mostraron una positividad citoplasmática granular difusa, de intensidad moderada (1 y 2). En el estroma, aunque algún fibroblasto mostró positividad, la inmensa mayoría de las células que se expresaron la hepsina fueron células de músculo liso (**Fig.30-31**). Ante la dificultad de cuantificar esta expresión estromal, no se realizó la valoración de la sobreexpresión en el estroma.

5.2 Neoplasia epitelial prostática de alto grado (PIN AG)

Las células epiteliales del PIN de alto grado mostraron un patrón de expresión citoplasmático vesicular grueso, con las vesículas en disposición predominantemente apical. Las células de la capa basal también presentaron cierta positividad.

5.3 Adenocarcinoma de próstata

Las células epiteliales de las glándulas neoplásicas mostraron un positividad de intensidad moderada- fuerte (2-3). El patrón de expresión fue citoplasmático vesicular grueso, con las vesículas dispuestas predominantemente en situación apical. Al igual que ocurría en las muestras de tejido normal el estroma se encontraba difusamente teñido (a expensas de fibras musculares lisas).



- **SOBREXPRESIÓN EPITELIAL DE HEPSINA**

Como se ha comentado con anterioridad, la sobreexpresión de hepsina sólo pudo valorarse en el compartimiento epitelial, debido a que la cuantificación de las células positivas en el estroma quedó imposibilitada por la tinción difusa de las fibras musculares lisas. Se estudiaron 21 casos.

a) **Sobreexpresión de hepsina y Ki-67**

De los 12 casos que sobreexpresaron la hepsina, 10 (83.3%) también sobreexpresaron el antígeno Ki-67 mientras que los otros 2 casos (16.7%) correspondieron a tumores que no lo hicieron. Se observa un asociación directa entre la sobreexpresión de hepsina y de Ki-67. Aunque esta relación no resultó ser significativa, sí se observó una tendencia hacia la significación ($p=0.080$).

	<i>Gleason</i>	<i>Estadio</i>	<i>PSA</i>	<i>Receptor</i>	<i>Ki-67</i>
Sobreexpresión Hepsina en epitelio	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>0.080</i>

Tabla VI: Correlaciones entre la sobreexpresión de Hepsina y parámetros clínico-patológicos.

4. EXPRESIÓN DE MASPINA

4.1 *TEJIDO PROSTÁTICO NORMAL*

La expresión de maspina en el epitelio glandular normal mostró un patrón citoplasmático, granular difuso, predominantemente en las células de la capa basal, (intensidad 2-3) mientras que las células luminales la intensidad fue más débil

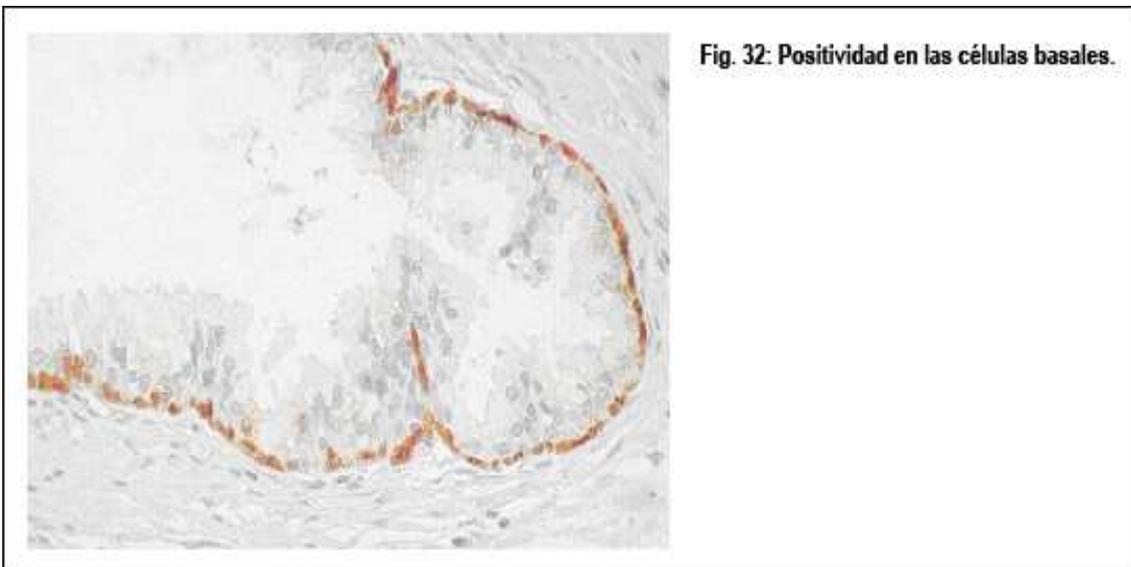
(Fig.32). En el compartimento estromal, la positividad fue también citoplasmática, si bien se observó cierta expresión nuclear.

4.2 NEOPLASIA INTRAEPITELIAL DE ALTO GRADO (PIN AG)

Característicamente, la positividad de la maspina en el PIN AG fue mayoritariamente localizada en las células de la capa basal, donde el patrón de expresión fue similar al observado en el tejido normal.

4.3 ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA

Al evaluar el tejido prostático neoplásico se comprobó que la positividad en las glándulas tumorales fue mucho menor que la observada en otras proteasas, siguiendo un patrón citoplasmático granular difuso con alguna positividad nuclear aislada (Fig.33-34).



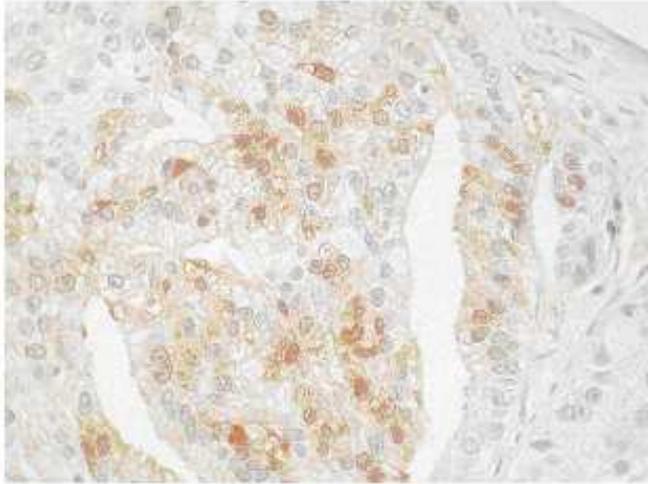


Fig. 33: Patrón granular difuso.



Fig. 34: Maspina en tumor
(caso negativo)

SOBREPRESIÓN DE MASPINA EN EL TEJIDO TUMORAL

- ***SOBREPRESIÓN DE MASPINA EN EL EPITELIO***

No se encontraron resultados estadísticamente significativos al analizar la expresión de maspina en el epitelio y los parámetros clínico-patológicos.

- **SOBREXPRESIÓN DE MASPINA EN EL ESTROMA**

a) **Sobreexpresión de maspina y estadio patológico**

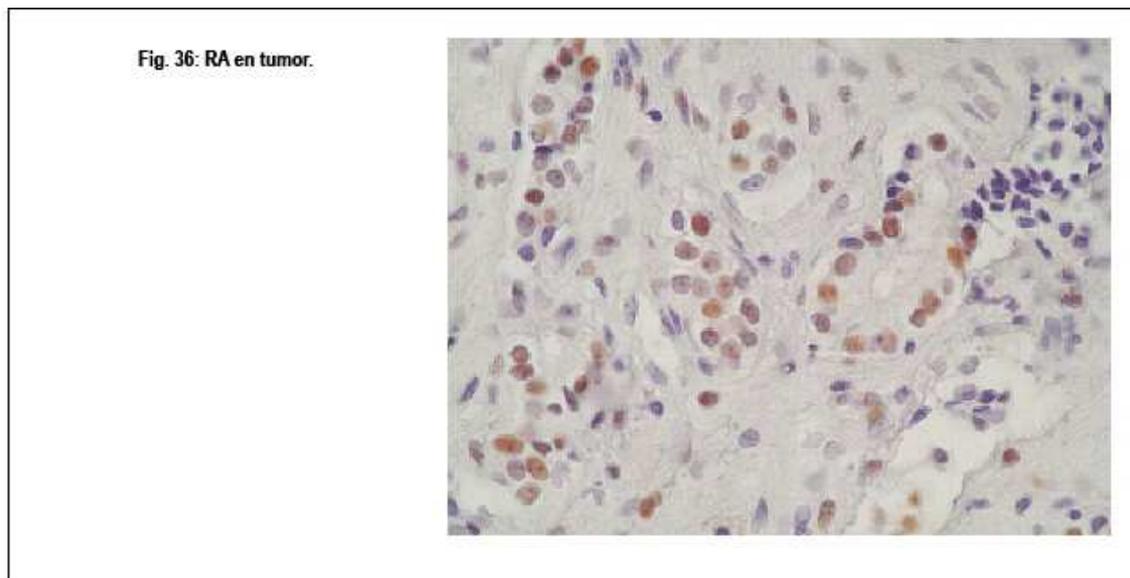
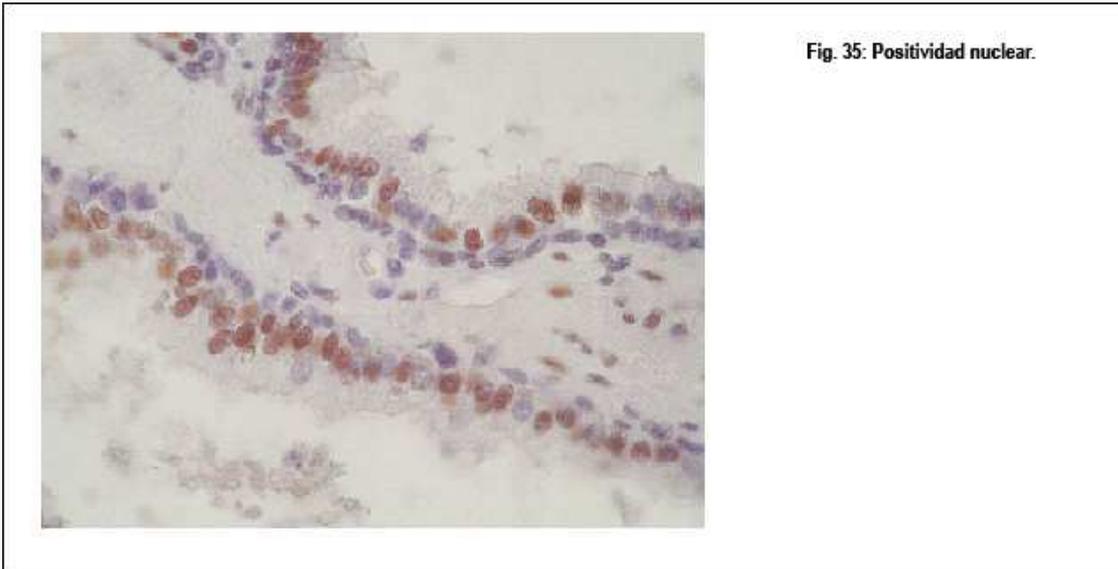
De los 48 casos que no sobreexpresaron maspina, 22 (45.8%) correspondieron a tumores localmente avanzados y 26 (54.2%) a localizados. Todos los tumores que mostraron sobreexpresión estromal de esta proteasa fueron tumores de estadio patológico avanzado. Se aprecia una cierta relación entre la sobreexpresión de maspina y un estadio tumoral avanzado, siendo esta relación casi estadísticamente significativa ($p=0.055$).

	<i>Gleason</i>	<i>Estadio</i>	<i>PSA</i>	<i>Receptor</i>	<i>Ki-67</i>
Sobreexpresión Maspina en epitelio	NS	NS	NS	NS	NS
Sobreexpresión Maspina en estroma	NS	0.055	NS	NS	NS

Tabla VII: Correlaciones entre la sobreexpresión de Maspina y parámetros clínico-patológicos.

5. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

La expresión del receptor de andrógenos fue marcadamente nuclear y limitada al compartimiento epitelial. Esta disposición se observó tanto en el tejido benigno como en el neoplásico (**Fig.35-36**). La positividad estromal fue ausente en la práctica totalidad de los casos estudiados.



a) Sobreexpresión del receptor de andrógenos y PSA

El valor medio de PSA en el grupo de tumores que sobreexpresaron el receptor fue de 22.00 ± 0.3 (11.360 ± 9.383). Se observa pues una diferencia entre los valores de PSA y la sobreexpresión del receptor androgénico, siendo ésta estadísticamente significativa ($p=0.002$).

	<i>Gleason</i>	<i>Estadio</i>	<i>PSA</i>	<i>Receptor</i>	<i>Ki-67</i>
Sobreexpresión RA en epitelio	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>0.002</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>

Tabla VIII: Correlaciones entre la sobreexpresión del RA y parámetros clínico-patológicos.

6. EXPRESIÓN DE KI-67

El tejido prostático normal fue prácticamente negativo para Ki-67, sin embargo y al igual que ocurría con el receptor androgénico, la expresión del antígeno en el tejido neoplásico se limitó al compartimiento epitelial, observándose una positividad predominantemente nuclear.

		<i>Sobreexpresión (N)</i>		<i>No Sobreexpresión (N)</i>	
Gleason	<i>Alto</i>	72%	18	42.86%	6
	<i>Bajo</i>	28%	7	57.14%	8
Estadio	<i>Local</i>	44%	11	64.28%	9
	<i>Avanzado</i>	56%	14	35.72%	5
PSA		11.433 ± 7.014		12.153 ± 13.608	

No se observaron diferencias estadísticamente significativas al analizar estos resultados.

7. RESUMEN

A continuación se presenta un resumen de las correlaciones encontradas en nuestro estudio (tabla IX).

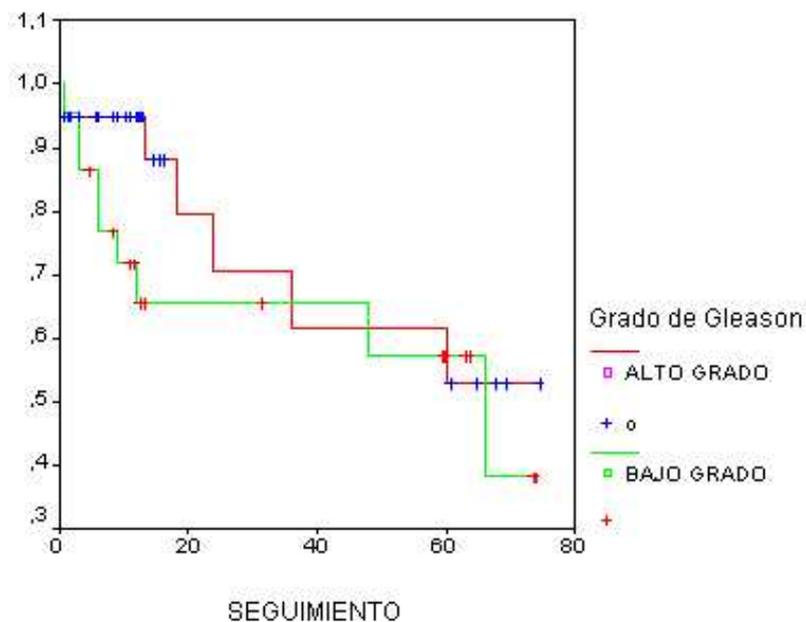
	CB		CL		Hepsin	Maspin		Recept	Ki-67
	Epit/Estr		Epit/Estr			Epit/Estr			
Gleason	0.074	0.049	NS	0.066	NS	NS	NS	NS	NS
Estadio	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.055	NS	NS
PSA	NS	NS	NS	0.08	NS	NS	NS	0.002	NS
Recept	NS	NS	NS	NS	---	NS	NS	---	---
Ki-67	0.046	NS	NS	NS	0.080	NS	NS	---	---

Tabla IX: Correlaciones entre la sobreexpresión variables experimentales y parámetros clínico-patológicos.

C. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA Y DE PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD

El análisis univariante previo a la relación del modelo incluyó esas variables clínicas con repercusión en la progresión de la enfermedad (PSA, grado de Gleason, Estadio patológico, márgenes de resección positivos y presencia de infiltración perineral).

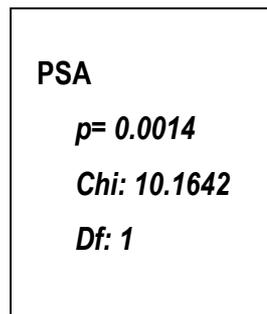
1. GRADO DE GLEASON



No se encontraron diferencias significativas en cuanto al análisis de supervivencia, pero esta variable sí puede ser incluida como candidata para el modelo final al cumplir el criterio de selección. Podemos interpretar al estudiar la gráfica que la función de supervivencia de cada grupo no es completamente paralela. Al realizar modelos predictivos según el método de Cox, la condición principal es de la proporcionalidad de los riesgos. Esta proporcionalidad está indicada por la distribución más o menos paralela de los valores de las curvas de supervivencia. En este caso los valores son paralelos al comienzo, por lo que pueden ser incluidos en el modelo.

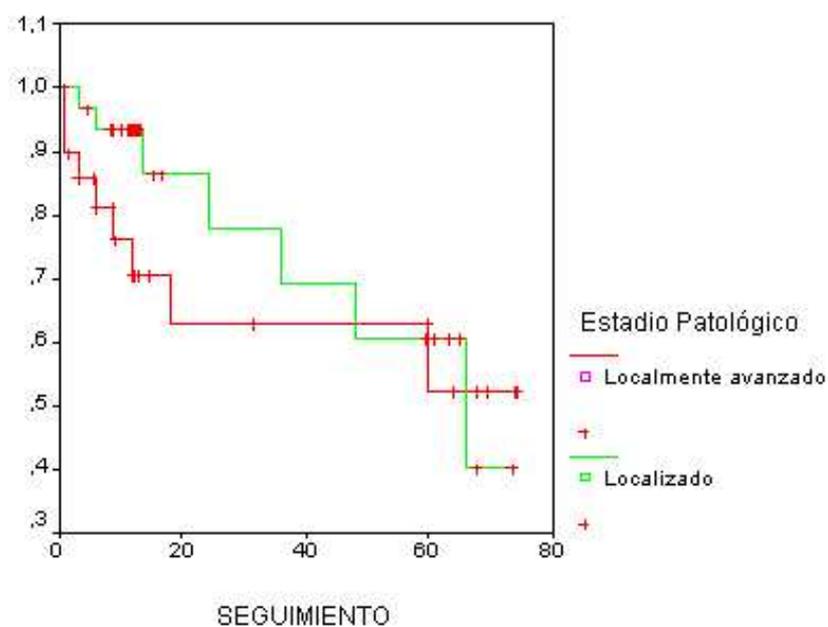
2. PSA

Se trata de una variable cuantitativa continua, por lo que no se puede calcular una curva de Kaplan-Meier, ya que eso supondría una curva para cada valor. En su lugar utilizamos la regresión de Cox para una única variable continua.



Por lo tanto y como esperábamos, PSA es un candidato para el modelo final, ya que cumple el criterio de selección.

3. ESTADIO PATOLÓGICO



Log Rank Test:

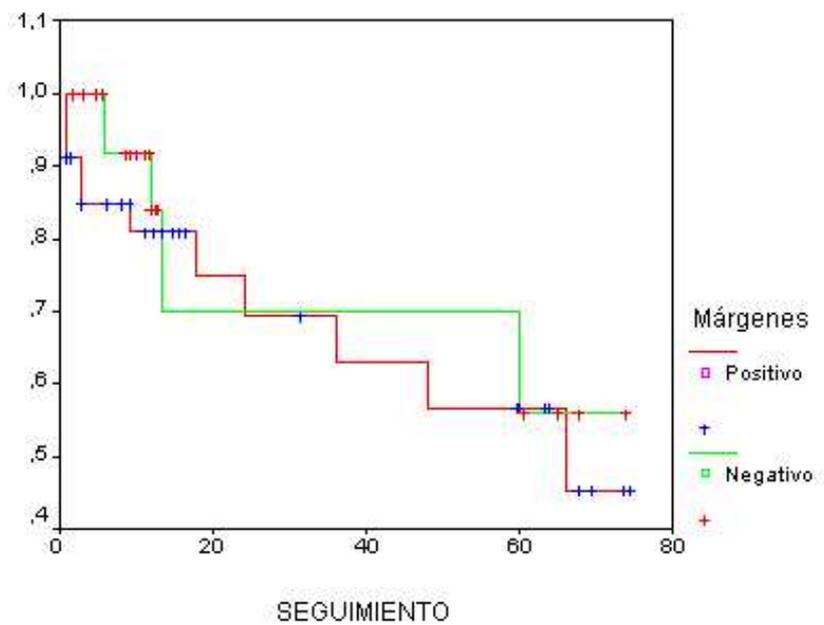
P=0.2225

Chi: 1.4885

Df: 1

El estadio patológico puede ser incluido en el modelo, al cumplir el criterio de selección. Al observar la gráfica podemos apreciar que las curvas de supervivencia de cada grupo son paralelas, cumpliendo con la condición de proporcionalidad.

4. MÁRGENES DE RESECCIÓN



Log Rank Test:

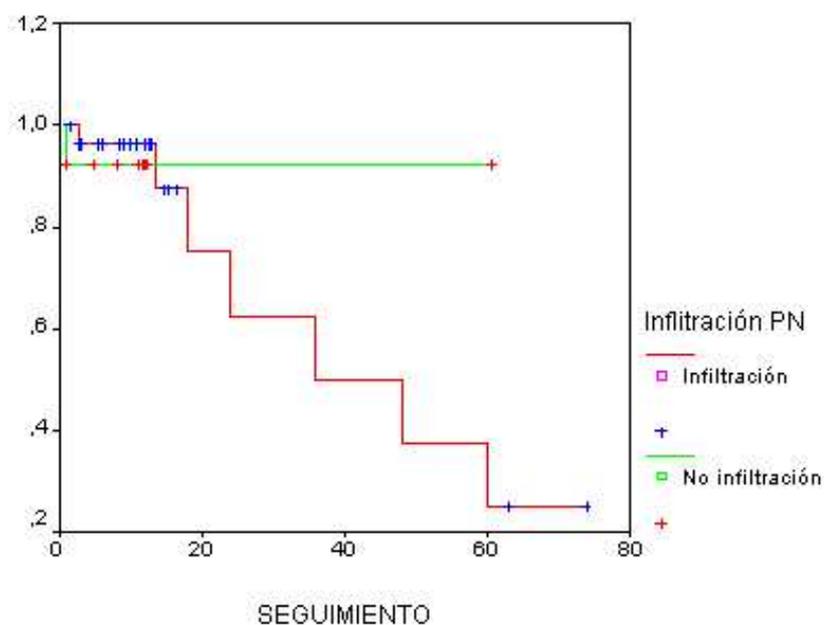
p= 0.49

Chi: 0.4741

Df: 1

El estado de los márgenes de resección no pueden ser incluidos en el modelo al no cumplir el criterio de selección. Las gráficas además, se desvían considerablemente de la proporcionalidad.

5. INFILTRACIÓN PERINEURAL



Log Rank Test:

$p=0.75$

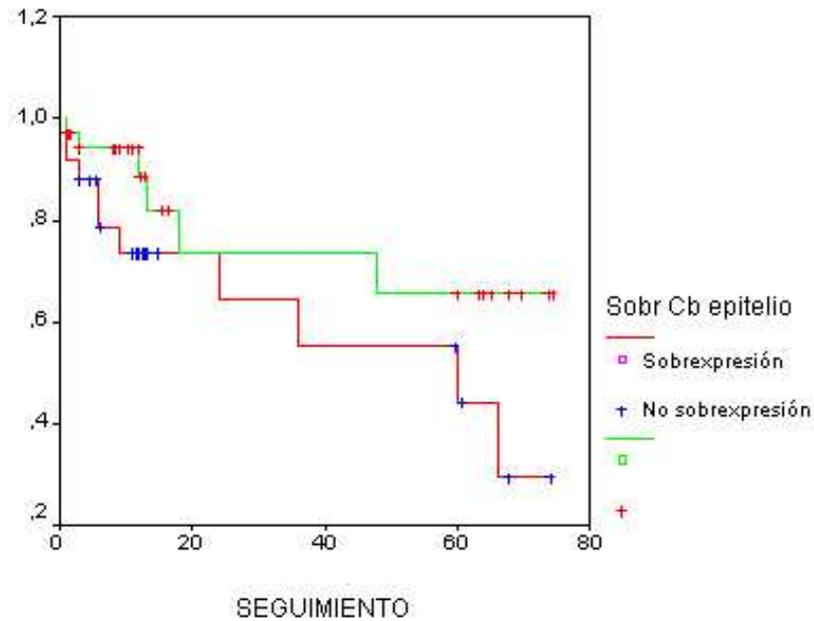
Chi: 0.0982

Df: 1

Esta variable no cumple el criterio de selección para ser incluida en el modelo final.

6. CB EN EPITELIO

De los 25 casos que mostraron sobreexpresión de CB 10 (40%) presentaron progresión bioquímica de la enfermedad, mientras que los 35 casos que no sobreexpresaron, sólo progresaron 6 (17.14%).



Log rank test:

P= 0.0893

Chi: 2.8867

Df: 1

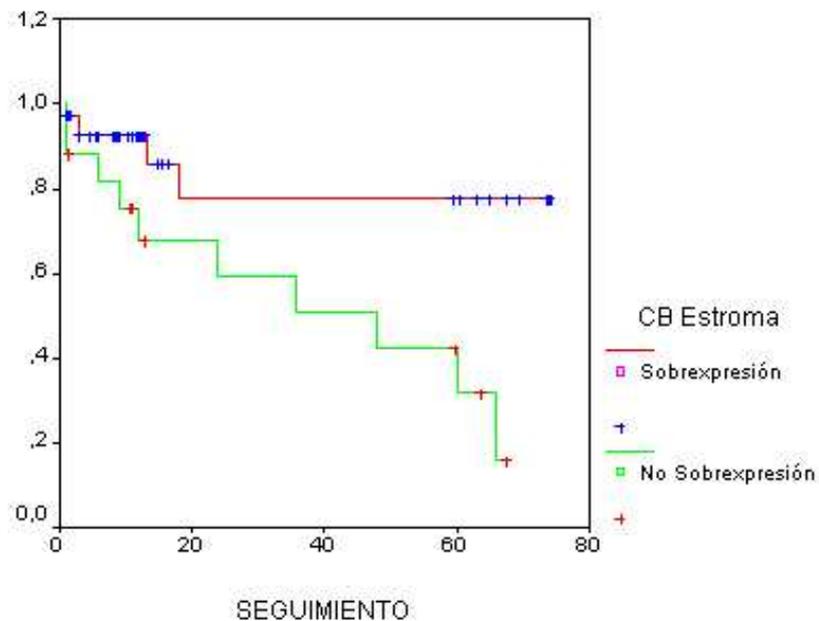
El análisis de las curvas de supervivencia muestra una mayor probabilidad de presentar recidiva bioquímica en el grupo de pacientes que sobreexpresaron la catepsina B en el compartimiento epitelial. Aunque esta diferencia no alcanzó el nivel de significación estadística, sí que se observó una tendencia hacia dicha significación ($p=0.0893$).

A su vez cumple el criterio de inclusión en el modelo final.

7. CB EN ESTROMA

De los 43 casos que sobrexpresaron la CB, sólo 5 de ellos (11.62%) progresaron. Por el contrario, 10 de los 17 que no sobrexpresaron (58.82%) presentaron recidiva bioquímica.

El análisis de las curvas de supervivencia indica que la probabilidad de que la enfermedad progrese es mayor en el grupo que no sobrexpresa la CB en el estroma, respecto del que sí lo hace. Esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa ($p=0.0059$).



Log Rank Test:

$p=0.0059$

Chi: 7.5852

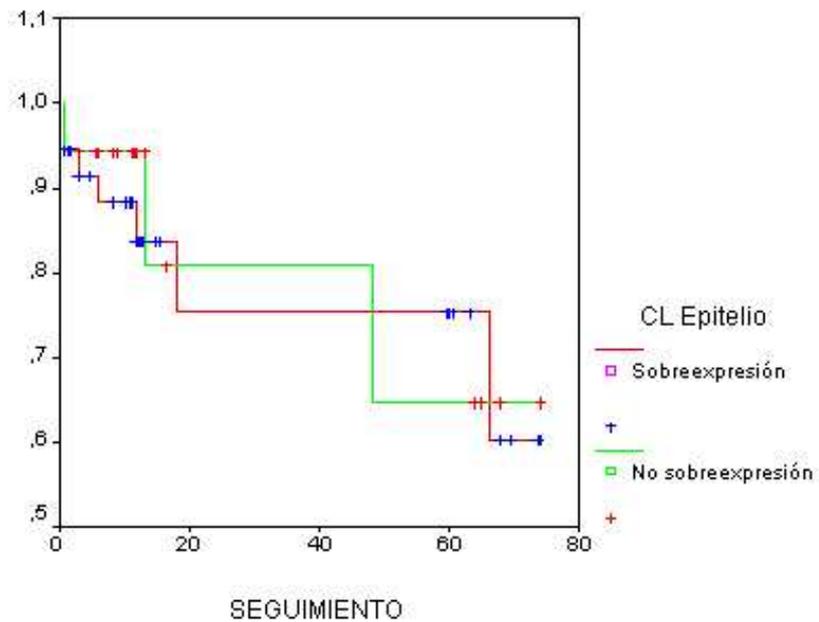
Df: 1

Por lo que puede ser incluida como candidata en el modelo final. La gráfica pone de manifiesto que, al comienzo, ambas funciones de supervivencia son paralelas.

8. CL EN EPITELIO

De los 37 casos que sobrexpresaron CL en el epitelio, 7 (18.92%) presentaron recidiva bioquímica, mientras que de los 18 que no presentaron sobreexpresión, 3 (16.67%) progresaron.

No pudieron constatarse diferencias estadísticamente significativas al comparar ambas curvas, en el análisis de supervivencia.



Log Rank Test:

P= 0.77

Chi: 0.0853

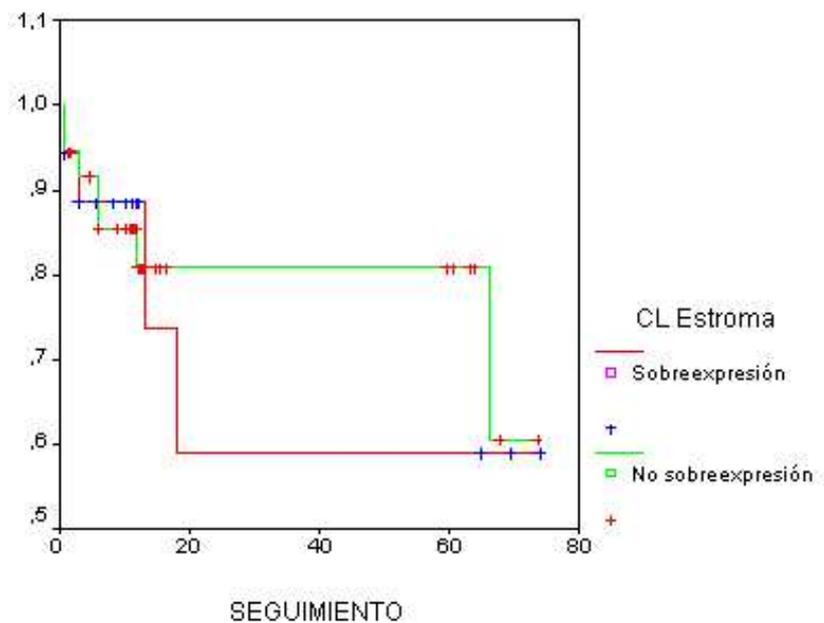
Df: 1

Esta variable no pudo incluirse en el modelo final a no cumplir el criterio de selección.

9. CL EN ESTROMA

De los 18 casos que mostraron sobreexpresión estromal de CL, 4 (22.2%) de ellos presentaron recidiva bioquímica. De los 37 casos que no sobreexpresaron la CL, 7 (18.92%) progresaron.

El análisis de las curvas de Kaplan-Meyer indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de pacientes.



Log Rank Test:

P=0.804

Chi: 0.0616

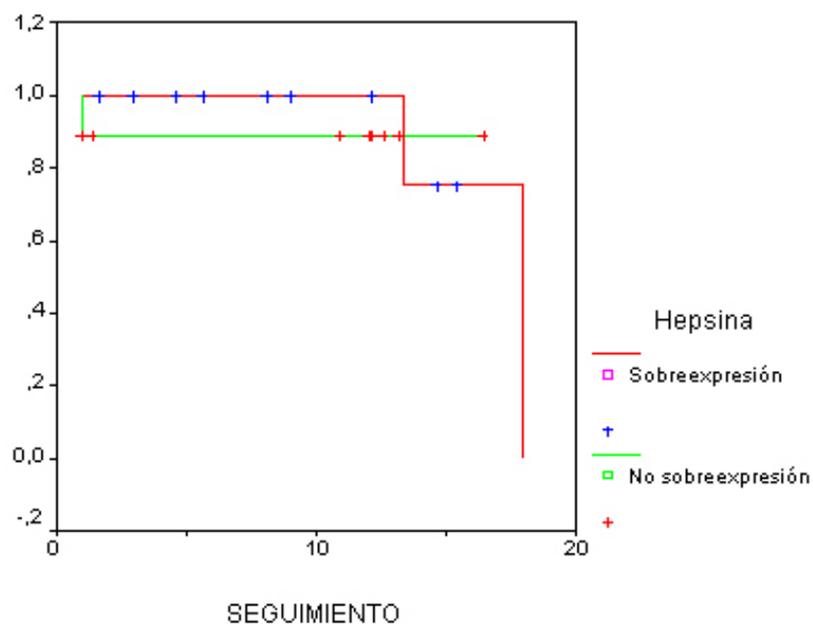
Df: 1

Esta variable no pudo ser incluida en el modelo final.

10. HEPSINA

De los 12 casos que presentaron sobreexpresión de hepsina, 2 (16.27%) presentaron recidiva bioquímica. De los 9 casos restantes, sólo en 1 (11.11%) se observó progresión de la enfermedad.

El análisis de supervivencia indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de pacientes con relación a la progresión.



Log Rank Test

$p=0.49$

Chi: 0.4729

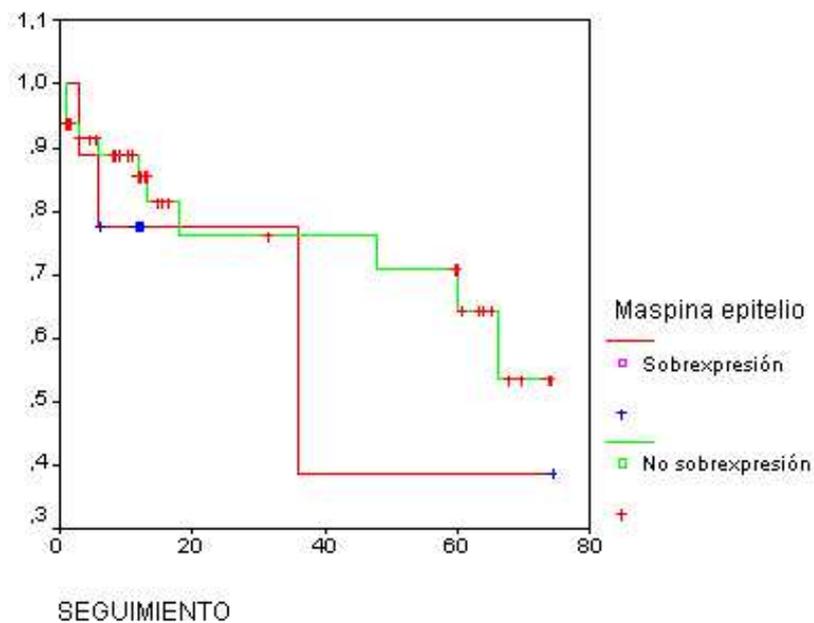
Df:1

Por lo tanto, no pudo ser introducida en el modelo.

11. MASPINA EN EPITELIO

De los 9 casos que mostraron sobreexpresión epitelial de maspina, 3 (33.3%) presentaron progresión bioquímica. De los 48 casos que no sobreexpresaron maspina, 11 (22.92%) presentaron recidiva.

Al comparar las curvas del análisis de supervivencia de ambos grupos de pacientes, no se encontraron diferencia estadísticamente significativas en cuanto a la progresión de la enfermedad.



Log Rank Test:

P=0.39

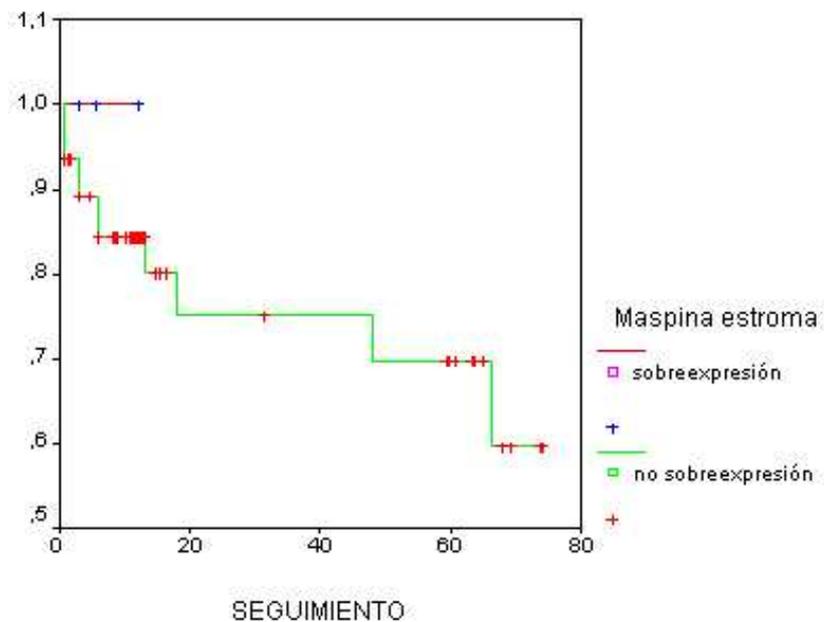
Chi: 0.7322

Df: 1

No se pudo incluir esta variable en el modelo final al no cumplir el criterio de selección.

12. MASPINA EN ESTROMA

De los casos que sobreexpresaron maspina en el estroma no se produjo ninguna recidiva. Por el contrario 11 (22.92%) de los 48 casos que no mostraron esta sobreexpresión, experimentaron aumento de los valores de PSA durante el seguimiento. El análisis de supervivencia no mostró diferencias entre los dos grupos de pacientes.



Log Rank Test:

P= 0.45

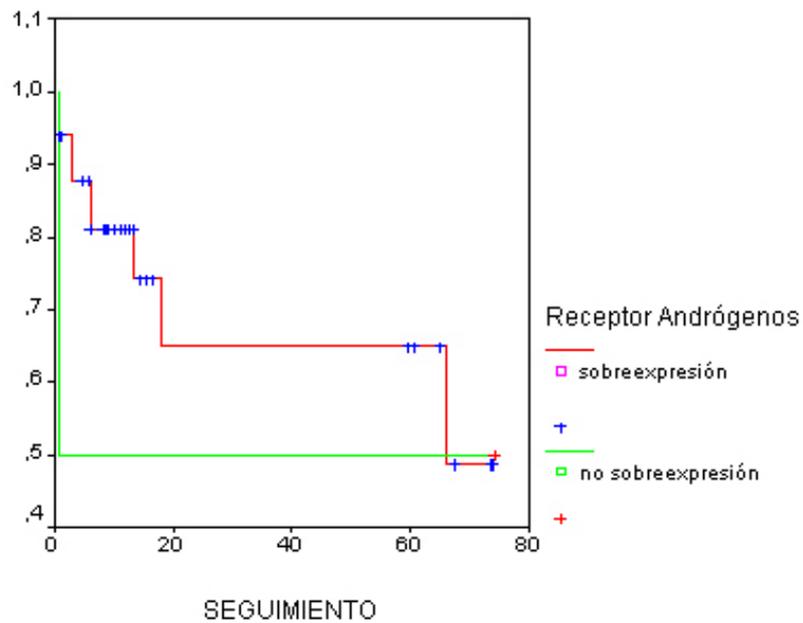
Chi: 0.5574

Df: 1

Esta variable no pudo incluirse en el modelo final.

13. RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

De los 34 casos que sobreexpresaron el receptor, 9 (26.47%) presentaron recidiva bioquímica. Sólo 1 caso de los 2 que no sobreexpresaron el receptor, progresó.



Log rank test:

$p= 0.71$

Chi: 0.1388

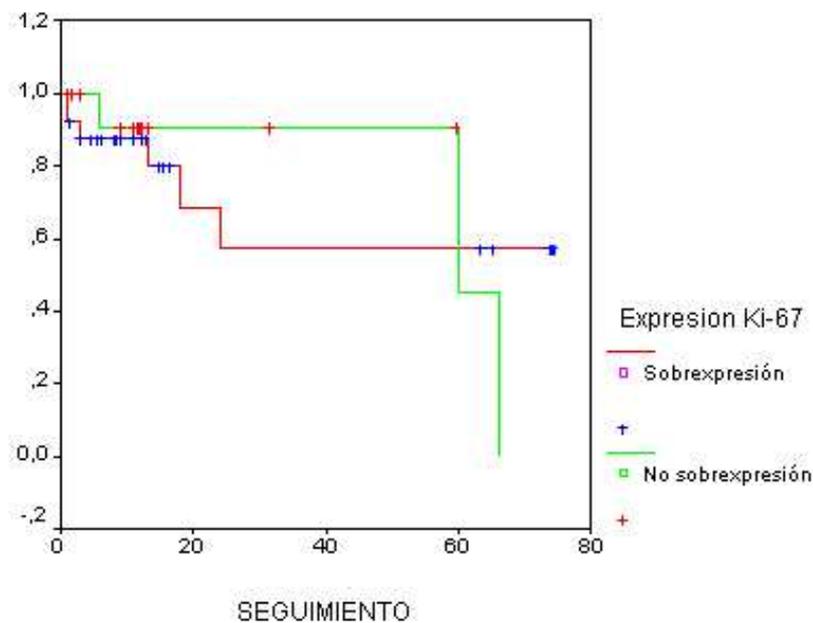
Df: 1

El análisis de supervivencia indica que no existen diferencias significativas, en cuanto al tiempo hasta la recidiva bioquímica, en ambos grupos de pacientes. Por lo que esta variable no fue candidata para el modelo final.

14. ANTÍGENO KI-67

De los casos que sobreexpresaron el antígeno, 6 (24.0%) presentaron recidiva bioquímica, mientras que en el grupo que no mostró sobreexpresión, 3 (21.43%) progresaron.

El análisis de supervivencia muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de pacientes con relación al tiempo hasta la recidiva.



Log-Rank Test:

P=0.9324

Chi: 0.0072

Df: 1

Esta variable no pudo ser incluida en el modelo.

CONSTRUCCIÓN DEL MODELO

El análisis de regresión de Cox es el método empleado para explorar los efectos de las distintas variables sobre la progresión de la enfermedad. Para la construcción del modelo, se incluyeron todas las variables que presentaron $p \leq 0.25$.

Variable	p
PSA	0.0014
Gleason	0.14
Estadio	0.2225
CB en epitelio	0.0862
CB en estroma	0.0059

Variable	DF	Parameter estimate	Standard Error	Chi square	P	Hazard Ratio
PSA	1	0.11508	0.0490	7.9152	0.0048	1.122
CB estroma	1	-1.11108	0.56488	3.8688	0.0492	0.329

El análisis de regresión muestra que la CB en el estroma presenta un riesgo relativo de 0.329, es decir el riesgo de progresión para los pacientes que presenten esta proteasa en el estroma es 33% menor que el riesgo para los pacientes que no la expresan.

De la misma forma, para el PSA (siendo una variable cuantitativa) el riesgo relativo es 1.122, lo que indica que por cada incremento del PSA en una unidad, el riesgo de progresar aumenta en un 12.2%.

DISCUSIÓN

El progresivo envejecimiento de la población y los avances en sus métodos de diagnóstico han convertido al cáncer de próstata en una de las enfermedades más prevalentes en la actualidad, siendo la segunda causa de mortalidad por cáncer en el varón, tras el cáncer de pulmón.

Esta enfermedad presenta un curso evolutivo incierto, y los parámetros clínico-patológicos habituales han demostrado ser insuficientes para predecir dicha evolución, por lo que se hace necesario el estudio de nuevos marcadores pronósticos complementarios, con el objetivo de intentar anticipar la evolución de un determinado tumor y consecuentemente ofrecer a los pacientes el tratamiento más adecuado.

Como se ha comentado previamente, el objetivo de este trabajo de investigación es el de evaluar la expresión de proteasas implicadas en los fenómenos de invasión del cáncer de próstata, estudiar su relación con la progresión de la enfermedad y eventualmente averiguar si esta expresión tiene utilidad como marcador pronóstico que nos permita predecir la evolución.

La realización de este trabajo de investigación nos ha permitido alcanzar los objetivos que nos marcamos al comienzo de nuestro proyecto.

La investigación de los cientos de potenciales marcadores pronósticos que continuamente se van identificando sobre preparaciones convencionales de tejido parafinado o fresco congelado se hace prácticamente inviable, ya que los costes y las variaciones de las condiciones físicas entre experimentos serían poco menos que imposible de asumir. Por ello se hace necesario el empleo de una técnica que permita este tipo de estudios reduciendo los costes y mejorando la estandarización, sin menoscabar la reproducibilidad y validez de los resultados.

La elaboración y uso de las matrices tisulares han resultado ser útiles para este tipo de estudios. Aunque originariamente descrita para el uso en la investigación del cáncer, nuevas aplicaciones de esta técnica están en constante desarrollo, como por ejemplo, los controles de calidad de las técnicas de inmunohistoquímica, la elaboración de bancos de tejidos y la formación continuada de los patólogos³¹¹.

Jourdan y colaboradores³¹³ publicaron un estudio de validación de las matrices tisulares en el que analizaron la expresión inmunohistoquímica de las proteínas p53, hMLN1 y hMSN2 (todas ellas relacionadas con la carcinogénesis del cáncer de colon). El objetivo global del estudio fue el de comprobar si los cilindros que constituían sus matrices eran lo suficientemente representativos del tumor en el bloque donante, es decir, si los cilindros contenían la muestra tumoral de interés para el estudio. Estos investigadores observaron que un mínimo porcentaje de los cilindros no presentaba el tumor, bien porque algunos cilindros fueron dañados al realizar la inmunohistoquímica (especialmente en el paso del desenmascaramiento antigénico), o bien porque se produjeron algunos errores a la hora de seleccionar el área de interés en el bloque donante. Por ello concluyen que la selección del tejido a estudiar en el bloque donante es crucial para minimizar el número de cilindros no valorables, aconsejando escoger áreas tumorales ricas en glándulas.

Otro estudio de validación de las matrices tisulares que merece la pena comentar es el realizado por Rubin y colaboradores³¹⁴, en el que analizaron la idoneidad de utilizar las matrices tisulares en el estudio de tumores fundamentalmente heterogéneos, como es el caso del cáncer de próstata. El estudio, en su fase inicial, consistió en el procesamiento habitual de una única pieza de prostatectomía radical e identificación de un área tumoral rica en glándulas neoplásicas. Esta área fue dividida en 10 regiones, para posteriormente 5 cilindros de cada una de ellas. A continuación, se evaluó la expresión del antígeno Ki-67 variando el número de cilindros incluidos en la matriz, con el fin de determinar el número óptimo de cilindros necesario para obtener una adecuada representatividad. Estos autores consideraron que, para poder aplicar con fiabilidad la técnica de las matrices tisulares en el cáncer de próstata, este número debía ser tres.

Sin embargo, otros estudios de validación, como los realizados por Nocito y colaboradores³¹⁵ y Toshorst y colaboradores³¹⁶ demostraron que un único cilindro, o dos a lo sumo, eran suficientes para los estudios clínico-patológicos, en cuanto a los análisis de marcadores pronósticos se refiere, si se comparaba con el estudio de las secciones individuales de los casos.

En lo que sí coinciden la práctica totalidad de los estudios de validación consultados es en que el número de cilindros necesario para la confección de las matrices tisulares viene determinado por el término medio ente el beneficio de la precisión en la representatividad y el coste de la cantidad de tejido que se requiere para el estudio. Lógicamente, un mayor número de

cilindros por caso a estudiar resulta en un menor número de casos y menos tejido disponible para estudios posteriores.

En nuestro trabajo, nosotros optamos por dos cilindros por cada caso, teniendo en cuenta que la representatividad del tejido tumoral no estaba en absoluto comprometida (las áreas de interés de las secciones completas fueron seleccionadas minuciosamente). Además, el diámetro de la aguja con la que obtuvimos nuestros cilindros fue mayor (1 mm).

Es oportuno señalar que la técnica de las matrices tisulares constituye una herramienta de investigación a la hora de evaluar la expresión de un gran número de marcadores en un gran número de casos, no un método para cuantificar la expresión exacta de una proteína en un determinado caso.

Si se comprueba que un marcador podría tener utilidad pronóstica, su cuantificación en cada caso de cáncer de próstata debería realizarse sobre las secciones completas de la pieza.

1. SOBREEXPRESIÓN DE CATEPSINA B

Una de las primeras lecturas que pueden sustraerse de los resultados obtenidos es la gran diferencia existente entre la expresión de CB en el tejido prostático normal, el PIN de alto grado y el tumor. En el tejido benigno (normal e hiperplásico) la expresión de CB quedó prácticamente circunscrita a la capa de células basales, si bien se observó positividad luminal en las glándulas cercanas a áreas de inflamación. También se observó positividad en las glándulas atróficas. No queda claro el significado de este hallazgo. Podría ser que las catepsinas participaran en la degradación de proteínas involucradas en los procesos de atrofia glandular, por lo que cabría esperar cierta expresión en el epitelio glandular atrófico. Es posible que la CB pueda estar implicada en los fenómenos de apoptosis³¹⁷ o en la remodelación de la membrana basal de glándulas que sufren cambios en el tamaño o en la tensión luminal²⁶³.

El patrón de expresión en las glándulas normales fue granular fino citoplasmático. Por el contrario, en las lesiones de PIN de alto grado, la expresión en el epitelio luminal fue mucho más evidente, presentando un patrón granular-vesicular fino basal (infranuclear), que se hará todavía más patente en el tumor. Estas observaciones parecen corroborar la teoría de la participación de las catepsinas en los fenómenos de transformación maligna y adquisición de fenotipo invasivo de

las glándulas prostáticas. Es interesante destacar que no sólo se trata de la diferencia en la expresión, sino en el patrón de dicha expresión. Tanto en la lesión premaligna como en la tumoral, la positividad observada se dispone en vesículas. La catepsina B (y demás catepsinas lisosomales) es sintetizada como proenzima (forma inactiva) y procesada intracelularmente por las células no transformadas, sin embargo las células malignas secretan las catepsinas al medio extracelular, donde ejercen su actividad enzimática interactuando con diferentes sustancias tisulares y degradando los componentes de la matriz extracelular^{246,318}. El patrón de expresión vesicular en los tejidos preneoplásico y maligno observado en este trabajo viene a apoyar este hecho.

De la misma forma, la disposición vesicular intracitoplasmática de la Cat B puede ser la causa de la mayor uniformidad de la expresión de Cat B observada en material parafinado que en el fresco-congelado, posiblemente debido a que estas vesículas tienden a romperse en los fenómenos de congelación y descongelación, al procesar este tipo de preparaciones²⁶⁴.

La actividad enzimática de las catepsinas sobre la matriz extracelular, que podría estar controlada por las células tumorales, viene reforzada por la presencia de positividad en el estroma, prácticamente ausente en el tejido prostático benigno.

Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Fernández et al²⁶³ al analizar la expresión de las catepsinas B y S en tejido prostático. La fuerte positividad de Cat B en la capa de células basales del epitelio normal, podría indicar su participación en los procesos de remodelación de la membrana basal u otras interacciones célula-estroma.

En el presente trabajo hemos evaluado la expresión de las proteasas tanto en el compartimento epitelial como en el estroma. Al parecer, este es el único estudio hasta la fecha en el que se ha valorado la asociación entre la expresión estromal, no sólo de la Cat B, sino de otras proteinasas citoplasmáticas, y los parámetros clínico-patológicos del cáncer de próstata. La razón de nuestro interés en el estroma se debe al creciente reconocimiento del papel que el huésped desempeña en los fenómenos de invasión y metástasis. Existe un mayor convencimiento de que el huésped participa en la invasión. Las células cancerosas cambian el compartimento estromal del huésped -como puede colegirse de las alteraciones morfológicas como desmoplasia, inflamación y respuesta inmune en forma de linfocitos, macrófagos y células dendríticas, angiogénesis (la

mayor respuesta del huésped al cáncer)- en un intento de establecer un entorno favorable que las permita subsistir y eventualmente invadir³¹⁹.

Cada vez resulta más evidente la existencia de interacciones complejas entre el epitelio y el estroma necesarias para la invasión y progresión de los tumores. Se ha observado que el entorno de un tumor prostático está formado por un estroma reactivo, compuesto por diferentes tipos celulares que han sido alterados para permitir la progresión de las células tumorales. Este estroma reactivo se caracteriza por un aumento en el número de miofibroblastos, en la producción de proteínas de la matriz extracelular y una mayor vascularización³²⁰, cambios parecidos a los que observados en el tejido de granulación, de ahí que se hayan constatado similitudes entre la angiogénesis tumoral y la observada en los fenómenos fisiológicos como la cicatrización de las heridas³²¹.

La idea de la participación de las células estromales en los fenómenos de invasión y progresión tumorales viene reforzada por la expresión de la proteína ps20, secretada por las células musculares lisas prostáticas, y que tiene una acción estimuladora de la motilidad celular endotelial. A su vez, la síntesis de esta proteína está directamente regulada por TGF- β , cuya influencia sobre la angiogénesis en diferentes modelos tumorales, incluido el cáncer de próstata, es bien conocida³²¹ y que además se le ha atribuido valor pronóstico de recidiva bioquímica tras la prostatectomía radical³²².

De la misma forma, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) desempeña un papel estimulador de la angiogénesis tumoral. La expresión de este factor de crecimiento, que es secretado por las células endoteliales y las células musculares lisas estromales, ha mostrado cierta correlación con los niveles de PSA preoperatorio y el grado de diferenciación de Gleason, en el cáncer de próstata³²³.

Debido a la importancia del estroma en la carcinogénesis prostática, el estudio de la expresión de las proteasas, limitado exclusivamente al compartimento epitelial, hubiera resultado un tanto incompleto.

También hemos querido no sólo valorar la expresión o positividad de las proteasas, sino cuantificar dicha expresión, de tal forma que pudiéramos hablar de sobreexpresión de las mismas y poder efectuar su estudio tanto descriptivo como analítico.

Los resultados obtenidos en cuanto a la sobreexpresión de Cat B en el **epitelio** se refiere son consistentes con la hipótesis de trabajo. Ya se ha comentado en el apartado de resultados que se observó una mayor sobreexpresión de Cat B en los tumores pobremente diferenciados. Parece razonable interpretar que la agresividad que un grado de Gleason elevado confiere a un determinado tumor, puede estar relacionada con una mayor producción de Cat B por dicho tumor, siendo éste más efectivo a la hora de penetrar y degradar la MEC y, por lo tanto, de invadir.

Sinha y colaboradores²⁶⁴ realizaron un estudio descriptivo sobre la localización epitelial de Cat B en cáncer de próstata, en el que observaron diferentes expresiones en función del grado de Gleason que presentaba el tumor. En general, estos autores comprobaron que el número de células epiteliales positivas para Cat B era mayor cuanto más pobremente diferenciado era el tumor. Sin embargo, esto no era así en los tumores catalogados como Gleason 9 y 10, concluyendo que la mayor actividad proteolítica de la Cat B se encontraba en los tumores con grados de diferenciación intermedios.

Posteriormente, publicaron un estudio en el que estudiaron la expresión de la razón entre Cat B y su inhibidor tisular (estefina A)³²⁴ y su relación con los parámetros clínico-patológicos del cáncer de próstata, no encontrando relación con ninguno de ellos. Si bien, hallaron diferentes patrones de expresión dentro de un mismo grado de Gleason, en concreto en los tumores que presentaron Gleason 6. Estos autores postulan que una preponderancia de la Cat B sobre su inhibidor explicaría la diferencia existente en cuanto al comportamiento clínico de los tumores con un mismo grado de diferenciación y que son considerados histológicamente iguales.

Estos trabajos, destacan la expresión de Cat B y su relación con su inhibidor tisular como probable responsable de la variabilidad clínica del cáncer de próstata dentro de un mismo grado de diferenciación. Nosotros consideramos que nuestros resultados vienen a reforzar la idea de que la expresión epitelial de Cat B puede ser el factor contribuyente a la agresividad que confiere al tumor un grado de diferenciación elevado.

No encontramos relación alguna entre la expresión epitelial de Cat B y nivel de PSA sérico preoperatorio, el estadio patológico y la expresión del receptor de andrógenos. No nos

sorprendió la ausencia de relación con el PSA, ya que el antígeno prostático específico es una proteasa de diferente composición bioquímica que las catepsinas (se trata de una serín proteasa involucrada en la licuefacción del fluido seminal^{265,325} y por lo tanto con mecanismos de acción y propiedades distintos).

El análisis de supervivencia (entendida como periodo libre de recidiva bioquímica de la enfermedad) realizado permite extraer conclusiones muy interesantes respecto al potencial valor pronóstico de la expresión epitelial de Cat B. Aunque las diferencias obtenidas no alcanzaron nivel de significación estadística, sí se observó una evidente tendencia hacia la significación que se confirmaría, en nuestra opinión, con un número mayor de casos.

En este momento parece oportuno comentar el trabajo realizado por AA Sinha²⁶⁶, con relación a la utilidad predictiva de la Cat B. Continuando con la valoración de la proporción Cat B y estefina A, comprobaron que la que la preponderancia de la proteasa sobre su inhibidor era la responsable de la diferente agresividad biológica del cáncer de próstata dentro de un mismo grado de diferenciación, y que además, esta preponderancia correlacionaba con la presencia de ganglios linfáticos metastásicos, lo que les permite concluir que la razón Cat B > estefina A constituye una herramienta útil como factor predictivo de afectación ganglionar y por tanto de mortalidad.

Hideaki Miyake y colaboradores³²⁶ intentaron establecer la utilidad de la concentración sérica de Cat B como marcador pronóstico de cáncer de próstata. Estos investigadores compararon la concentración sérica de Cat B y su densidad (es decir la razón entre esta concentración y el volumen prostático determinado por ecografía transrectal) entre individuos sanos y afectos y comprobaron que estas concentraciones eran superiores en los pacientes con cáncer de próstata. Todavía más, estas concentraciones fueron superiores en pacientes con enfermedad localmente avanzada que en aquellos con enfermedad localizada. Sin embargo no encontraron asociación con el resto de parámetros clínico-patológicos ni con la supervivencia de la enfermedad.

Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión epitelial de Cat B está asociada a una mayor probabilidad de presentar recidiva bioquímica en el curso evolutivo de la enfermedad, y por lo tanto, puede ser útil como marcador pronóstico de progresión.

Con anterioridad se ha comentado el interés en estudiar la expresión de las proteasas en el **compartimento estromal**. Los resultados obtenidos al valorar la expresión de Cat B en el estroma son un tanto contradictorios respecto a los correspondientes al epitelio.

Al igual que ocurría en el compartimiento epitelial, la sobreexpresión de Cat B en el estroma se asocia a un mayor grado de Gleason, es decir, tumores pobremente diferenciados tienden a sobreexpresar Cat B en el estroma. Una vez más se constata la mayor producción de esta proteasa por los tumores pobremente diferenciados. Al igual que ocurría en el epitelio, no encontramos relación con el nivel de PSA sérico preoperatorio, el estadio tumoral y el receptor de andrógenos. Creemos, por tanto, que la acción proteolítica de Cat B se realiza de forma independiente respecto a estos parámetros.

Sin embargo, esta mayor sobreexpresión estromal fue más frecuente en los casos que no presentaron progresión bioquímica de la enfermedad. En análisis de supervivencia realizado y el posterior modelo predictivo pusieron de manifiesto que la sobreexpresión de Cat B en el compartimento estromal en el cáncer de próstata se comporta con factor independiente de buen pronóstico. Según este resultado, la cuantificación de la expresión estromal de esta proteasa permitiría predecir la posibilidad de progresión del tumor, por lo que su utilidad clínica a la hora de establecer la estrategia terapéutica resulta muy interesante.

Al parecer, los mecanismos de acción e interacciones de la Cat B en el compartimento estromal podrían corresponder a una respuesta por parte del huésped a la invasión, (ya hemos comentado su participación en los fenómenos de la presentación de antígenos²⁵⁸) de tal forma que en los casos donde esta respuesta fuera insuficiente o anómala, las concentraciones de Cat B en el compartimento estromal disminuirían, permitiendo la invasión y progresión del tumor. Podría ocurrir que el mismo producto tumoral se comportara como un elemento invasivo en el epitelio, pero en el estroma, podría actuar desdoblado otras moléculas favorecedoras de la invasión.

2. SOBREPRESIÓN DE CATEPSINA L

La catepsina L es una de las proteasas más ubicuas del organismo, estando presente en prácticamente todos los tipos celulares. Se le considera el principal responsable de la degradación y recambio de las proteínas intracelulares. Una vez secretada al medio extracelular,

se encarga de regular la función de otras proteínas. Chauhan y colaboradores³²⁷ realizaron un estudio con el fin de valorar su sobreexpresión en diferentes neoplasias humanas y observaron que tumores de esófago, estómago, colon, suprarrenal, riñón, pulmón e hígado presentaron niveles elevados de Cat L, siendo los niveles más altos los encontrados en las neoplasias de riñón y testículo.

Escasa es la información disponible sobre la expresión de esta proteasa en el cáncer de próstata, siendo nuestro estudio, el único hasta la fecha, en realizar el estudio inmunohistoquímico “in vivo” de Cat L en tejido prostático.

Hemos encontrado ciertas similitudes entre la expresión de Cat L y Cat B, al comparar su patrón de expresión en el tejido prostático normal y tumoral.

Al igual que ocurría con la Cat B, existe una gran diferencia en cuanto a la expresión e intensidad de esta expresión en el tumor con respecto a las observadas en el tejido normal. De nuevo es importante destacar la disposición en vesículas en el epitelio luminal en los casos de PIN y tumor, como corresponde a proteasas lisosomales, almacenadas en el citosol celular y secretas al medio extracelular.

De la misma forma, la positividad observada en el estroma tumoral (ausente en el tejido prostático benigno) viene a apoyar la idea de la participación de la Cat L en la degradación de la matriz extracelular facilitando la invasión, progresión y metástasis de las células transformadas.

Los mecanismos últimos por los que la Cat L ejerce su acción en el estroma no están del todo claros, pero se ha señalado que una vez secretada al compartimiento extracelular, podría activar receptores de la superficie celular o factores de crecimiento que estimularían la proliferación e invasión del tumor³²⁸. A modo de ejemplo, la Cat L secretada por las células del melanoma maligno desdoblan el componente C3 del complemento, inhibiendo de esta manera la lisis celular mediada por el complemento³²⁹.

No nos sorprendió el hecho de encontrar positividad en fibroblastos y macrófagos estromales, ya que estas células, una vez activadas, aumentan la síntesis de Cat L³²⁷.

Otra observación interesante que merece la pena destacar es la positividad de Cat L en las células del endotelio vascular, fenómeno que atribuimos a la participación de esta proteasa en los fenómenos de angiogénesis.

Al analizar la sobreexpresión de Cat L y su correlación con los demás parámetros clínico-patológicos, hemos observado una cierta tendencia a la asociación con un mayor grado de Gleason en el compartimento estromal y con el nivel de PSA preoperatorio.

A tenor de estas observaciones, podría interpretarse que la agresividad biológica de los tumores pobremente diferenciados, localmente avanzados, viene conferida por la actividad de esta proteasa. Si bien, se hace necesario el estudio de un mayor número de casos para corroborar esta hipótesis.

Existen diversos estudios en los que se ha tratado de evaluar el valor pronóstico de la Cat L. Entre ellos, el realizado por Thomssen y colaboradores³³⁰ sobre una muestra de 167 pacientes afectas de cáncer de mama. Estos autores determinaron la concentración de Cat L tanto en tejido tumoral como en tejido benigno, encontrando una mayor concentración de la proteasa en el tumor. Además, aunque no demostraron correlación alguna con los parámetros clínico-patológicos convencionales como el tamaño tumoral, el estado de los ganglios linfáticos axilares, edad, grado histológico o invasión vascular, sí encontraron una asociación directa entre la alta concentración de Cat L y un mayor riesgo de recidiva. Incluso, en su análisis comprobaron que los tumores que expresaron mayor concentración de Cat L tenían una supervivencia a los 5 años significativamente menor que los que no lo hicieron. Por último, La expresión de Cat L se comportó como factor pronóstico independiente casi tan potente como el estado de los ganglios axilares, considerado como el parámetro histopatológico y clínico más importante en el cáncer de mama.

Otro estudio interesante, esta vez relacionado con el carcinoma colo-rectal es el realizado por Troy y colaboradores³³¹. Estos autores analizaron la expresión de Cat B y L y la proporción existente entre las concentraciones de las proteasas en el tejido tumoral y el sano de 99 pacientes. El resultado más interesante que obtuvieron fue que la supervivencia estaba inversamente relacionada con la expresión de Cat L, en los tumores en estadio localizado (I-III), pero no en los que presentaban enfermedad metastásica. Estos investigadores atribuyen este

resultado a la idea comúnmente aceptada de que la actividad proteolítica de las catepsinas se realiza en las etapas iniciales de la invasión tumoral.

También hemos comprobado la positividad de esta proteasa en las células del endotelio vascular. Estos resultados son similares a los obtenidos por Strojnik y colaboradores³³², quienes al estudiar la expresión de esta catepsina en los gliomas cerebrales, encontraron una asociación entre dicha expresión y un menor grado de diferenciación. Estos investigadores concluyen que la Cat L puede estar relacionada con la transformación maligna de los tumores cerebrales.

Nuestros resultados no permiten atribuir a la Cat L un valor pronóstico, pero sí parecen indicar la relevancia de esta proteasa en los fenómenos tempranos de la transformación maligna (como puede interpretarse de su marcada expresión en el PIN con relación al tejido benigno) y en la degradación de la matriz extracelular como vehículo para la invasión. Pensamos que la tendencia a la asociación observada entre un grado de Gleason elevado y la mayor producción de PSA (ambos parámetros ampliamente aceptados como indicadores de agresividad tumoral) corresponde a una mayor producción de Cat L, responsable de la capacidad invasora de estos tumores.

3. SOBREPRESIÓN DE HEPSINA

Tras su descubrimiento como marcador tumoral por medio de los “microarrays” de ADN, la hepsina se ha convertido en objeto de gran interés en los últimos años. Esta tecnología permite el estudio simultáneo de la expresión de miles de genes, e identificar de forma eficiente los cambios de expresión génica que acompañan a los procesos de carcinogénesis.

Varios estudios han puesto de manifiesto que el gen de la hepsina se encuentra fuertemente sobreexpresado en el cáncer de próstata^{285,287,333}, por lo que esta proteasa es considerada como un posible objetivo de futuras terapias génicas.

En el presente trabajo, hemos estudiado la expresión proteica de hepsina en el cáncer de próstata, con el fin de confirmar que la sobreexpresión del gen se traduce realmente en la síntesis de la proteína efectora, y para intentar describir sus patrones de expresión desde un punto de vista morfológico (los microarrays de cDNA y las técnicas de cuantificación de la

expresión génica como la RT-PCR, no permiten discriminar entre la expresión estromal, epitelial, citoplasmática, nuclear o de la membrana plasmática).

El papel que desempeña la hepsina en el cáncer de próstata continua siendo objeto de debate. Aunque la opinión generalizada es que esta proteasa se encuentra sobreexpresada en el cáncer de próstata, no está claro el impacto que esta sobreexpresión puede tener sobre la evolución de la enfermedad.

Magee y colaboradores²⁸² estudiaron la expresión de hepsina mediante hibridación in situ (FISH), observando esta expresión en el epitelio luminal normal era mucho menor que en las glándulas neoplásicas, donde la expresión era mucho más intensa, y localizada en las células tumorales epiteliales, no en el estroma. A su vez, las lesiones de PIN de alto grado también presentaron una expresión mayor que el epitelio normal. Para estos autores, la expresión de hepsina correlaciona con la transformación neoplásica de la próstata y se manifiesta en las células epiteliales.

En la misma línea se encuentra el trabajo realizado por Stephan y colaboradores³³⁴, que estudiaron la expresión de esta proteasa mediante RT-PCR cuantitativa. También estos investigadores observaron una mayor sobreexpresión de hepsina en el epitelio tumoral y premaligno, que en la próstata normal, concluyendo que su sobreexpresión epitelial correlacionaba con la transformación maligna de las glándulas prostáticas. Sin embargo no encontraron ninguna asociación significativa con los parámetros clínico-patológicos convencionales del cáncer de próstata. Por el contrario, existen otros estudios en los que se cuestiona esta correlación e incluso se advierte que la expresión de hepsina puede estar inversamente relacionada con la progresión de la enfermedad.

Es el caso del trabajo realizado por Srikantan y colaboradores²⁸⁸, en el que se estudiaron la expresión y función biológica de la hepsina, sobre distintos cultivos celulares de cáncer de próstata (LNCaP, DU145 y PC-3). La expresión sólo se demostró en LNCaP, siendo negativa en las otras líneas celulares. Con el objeto de investigar la función de la proteasa, la hepsina fue transferida a estas otras líneas, y se observó que el crecimiento celular presentó una disminución del 75 %, con respecto a los cultivos que no presentaron expresión para hepsina, lo que se traduce en una regulación negativa del crecimiento celular por parte de esta proteasa. De la misma manera, estos autores comprobaron que la expresión de hepsina inhibía la motilidad y

capacidad invasiva celulares, a la vez que aumentaba el número de células que se encontraban en fase de apoptosis. Estos investigadores llegan a la conclusión de que la expresión de hepsina podría evitar que las células tumorales adquiriesen un fenotipo más agresivo o la capacidad de metastatizar.

Otro estudio que viene a apoyar esta idea es el realizado por Dhanasekaran y colaboradores²⁸⁵. Estos investigadores construyeron una matriz de tejido en la que incluyeron tejido prostático normal, PIN de alto grado y adenocarcinoma, tanto localizado como metastásico, y estudiaron la expresión de hepsina. Curiosamente, el mayor nivel de expresión lo encontraron en los casos de PIN, mientras que los niveles de menor expresión se observaron en el tejido benigno y en las muestras de cáncer metastásico hormono-refractario. Además, encontraron una asociación significativa entre la recidiva bioquímica de la enfermedad y la ausencia de expresión de la hepsina, e incluso con un mayor riesgo de presentar elevación del PSA tras la prostatectomía. Para estos investigadores, la expresión de hepsina se correlaciona con un pronóstico favorable para estos pacientes.

Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Magee y Stephan. Nosotros encontramos una mayor positividad en los casos de tumor prostático, en comparación con el tejido benigno, lo que viene a apoyar la hipótesis de una participación de la hepsina en la transformación maligna de la próstata, si bien no hallamos ninguna asociación con la progresión de la enfermedad o con otros parámetros clínico-patológicos. Sin embargo encontramos una tendencia a la significación estadística entre la sobreexpresión de hepsina y la de Ki-67. Como se ha comentado previamente, el antígeno Ki-67 es aceptado como un indicador de proliferación celular. Este resultado contradice el obtenido por Srikantan, (la expresión de hepsina inhibe la proliferación en líneas celulares derivadas del cáncer de próstata metastásico). A nuestro modo de ver, la hepsina podría desempeñar su actividad proteolítica en estadios precoces de la enfermedad, y esta actividad estaría muy relacionada con su nivel de expresión. Tumores con un alto índice proliferativo producirían mayor cantidad de hepsina, y esta proteasa participaría en los fenómenos de degradación de la de la matriz extracelular y las membranas basales. Es probable que en cultivos celulares, estas células epiteliales tumorales tengan dificultades en mantener la adhesión al sustrato, separándose de la superficie del cultivo y finalmente entrando en apoptosis. De la misma manera, esta capacidad de degradar la matriz, necesaria para la invasión tumoral en los estadios precoces del proceso invasivo, puede que dificulte la formación tardía de

metástasis, ya que la capacidad de adherirse de novo a la matriz es vital para la supervivencia de la célula metastásica.

4. SOBREXPRESIÓN DE MASPINA

La expresión de maspina y el papel que desempeña en la carcinogénesis prostática es objeto de interés creciente debido a los datos, un tanto contradictorios, que se han ido observando en diferentes trabajos de investigación.

Ya hemos comentado en la introducción que la maspina constituye el producto de un gen supresor de clase II, perteneciente a la súper familia de las serpinas (o proteínas inhibidoras de las serín-proteasas), a las que se le atribuyen diferentes efectos antitumorales como la inhibición del crecimiento, motilidad e invasión tumorales, la angiogénesis inducida por el tumor o estimulación de la adhesión celular^{294,295}. Sin embargo, existen estudios que relacionan su expresión con progresión tumoral^{335,336}.

Nuestros resultados describen una pérdida de expresión de la maspina en el tejido tumoral prostático, en comparación con el tejido normal y el PIN de alto grado. Ya que la mayor positividad se encontró en la capa de células basales del epitelio glandular normal y premaligno, no es de extrañar que en las glándulas transformadas esta positividad fuera disminuyendo con la desaparición de dicha capa basal propia del cáncer de próstata. Estos datos apoyarían la idea de que la maspina participaría en la cohesión y adhesión celulares, reforzando las interacciones entre el epitelio y el estroma, y su pérdida de expresión podría facilitar la ruptura de las membranas basales y la eventual invasión del tumor.

Esta hipótesis viene reforzada por el hecho de que la maspina presenta una gran afinidad por diversos componentes de la matriz extracelular, como la fibronectina y la laminina, e interacciona de forma directa con el colágeno tipo I y III, fomentando la actividad integrina, lo que resulta en mayor adhesión de las células al estroma²⁹⁴.

Otros estudios han encontrado resultados similares, como el realizado por Bass y colaboradores²⁹⁵, en el que se afirma que la maspina, directa o indirectamente contribuye a la

adhesión celular, principalmente por unirse al colágeno, participando así en la regulación de la motilidad celular.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Pierson y colaboradores³³⁷, quienes estudiaron la expresión de maspina en el cáncer de próstata, empleando técnicas de inmunohistoquímica y FISH. Estos autores observaron una expresión bifásica de maspina, es decir, prácticamente ausente en las células secretoras normales, intensamente expresada en las del PIN de alto grado y reduciéndose progresivamente en las lesiones cancerosas de bajo grado hasta casi desaparecer en el cáncer pobremente diferenciado. Estas observaciones plantean la posibilidad de que maspina desempeñe un papel significativo en la prolongación en el tiempo de las lesiones premalignas, y que la pérdida de su expresión desencadene la transformación maligna de la próstata.

Resultados similares fueron aportados por Zou y colaboradores³³⁸. Estos investigadores observaron escasa o nula positividad para maspina en muestras obtenidas de piezas de prostatectomía radical. Llama la atención el hecho de que la expresión más intensa se detectó en los tumores que habían sido tratados con bloqueo androgénico neoadyuvante, lo que apunta la posibilidad de que la expresión de maspina se produzca como respuesta a la supresión androgénica. Al analizar la expresión de maspina con los diferentes parámetros clínico-patológicos, encontraron una asociación entre esta expresión y el grado de diferenciación tumoral, pero en el análisis multivariante sólo este parámetro resultó significativo. Tampoco resultó significativa como factor predictivo de progresión de la enfermedad.

Aunque la expresión de maspina en el cáncer de próstata no parece ser relevante, estos autores encontraron sobreexpresión de maspina en los tumores que habían sido tratados con bloqueo androgénico con anterioridad a la prostatectomía radical, y en los tumores que exhibieron respuesta a la deprivación hormonal. Estos datos sugieren que la deprivación androgénica podría desenmascarar la expresión de maspina en el cáncer de próstata, y por lo tanto, tener utilidad pronóstica como marcador de respuesta a la terapia hormonal.

La principal aportación de nuestro trabajo, en cuanto a la expresión de maspina se refiere, es la demostración de su expresión en el compartimiento estromal. Ninguno de los estudios anteriormente citados hallaron positividad en el estroma. Nosotros encontramos una asociación con tendencia a la significación estadística, entre esta expresión y el estadio

patológico del tumor. Este resultado apoyaría la idea de una mayor participación de la maspina en las interacciones extracelulares como respuesta a la invasión, si bien, debemos tener en cuenta que la expresión inmunohistoquímica de estas proteínas puede no traducir su verdadera actividad funcional.

La comparación de maspina con otras proteasas no produjo resultados significativos en nuestro estudio. Se intentó realizar un análisis parcial entre la sobreexpresión de maspina y hepsina, pero no fue posible debido a un número muy pequeño de casos en los subgrupos.

5. SOBREPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Prácticamente la totalidad de los casos de cáncer de próstata estudiados en este trabajo presentaron positividad para el receptor de andrógenos (RA). Al realizar el análisis de sobreexpresión, pudimos observar que la gran mayoría de casos sobreexpresaban dicho receptor. Diversos estudios han puesto de manifiesto el hecho de que el RA se encuentra presente en el cáncer de próstata, tanto primario como metastásico, independientemente del grado de diferenciación o del estadio tumoral^{301,339,340}. Nosotros tampoco encontramos relación alguna con el grado de diferenciación de Gleason o con el estadio tumoral, sin embargo, sí encontramos una asociación directa significativa entre la sobreexpresión de RA y el valor del PSA preoperatorio. No nos resultó extraña tal asociación ya que la producción de PSA es la consecuencia inmediata de la activación del RA.

Un resultado similar fue obtenido por Zegarra-Moro y colaboradores³⁴¹. Estos autores investigaron la actividad del receptor androgénico en distintos cultivos celulares (LNCaP, LNCaP-Rf, LNCaP-C4 y DU-145) empleando un anticuerpo específico contra el RA y comprobaron que la producción de PSA se reducía drásticamente al bloquear el receptor, lo que indicaba la actividad funcional del mismo. Además comprobaron que en ausencia de andrógenos, la proliferación de las células de cáncer de próstata quedaba inhibida, lo que apoya la idea de un papel relevante del RA en la progresión de la enfermedad, incluso en la situación de privación androgénica.

No encontramos relación ente la sobreexpresión de RA y la progresión de la enfermedad. Sin embargo es interesante destacar que no encontramos positividad en el compartimento estromal. Esta observación nos parece muy interesante, sobre todo si la comparamos con los resultados obtenidos por Henshall y colaboradores³⁴². Este grupo de investigadores analizó la expresión del receptor de andrógenos en muestras de prostatectomía radical encontrando positividad tanto en el compartimento epitelial como en el estroma. Tampoco observaron ninguna relación entre la expresión del RA en el epitelio con los parámetros clínico-patológicos convencionales, sin embargo, la positividad en el compartimento estromal les permitió subclassificar esta expresión en las áreas adyacentes al epitelio neoplásico y en otras áreas del estroma. Curiosamente, comprobaron que la pérdida de expresión del RA en el estroma próximo al tumor, correlacionaba directamente con un mayor grado de diferenciación, con el valor de PSA preoperatorio y con una recidiva bioquímica temprana de la enfermedad.

El papel que el receptor de andrógenos desempeña en el estroma tumoral y su posible relación con la progresión de la enfermedad están aún por dilucidar, pero parece ser que su expresión influye de una forma importante en la transformación del epitelio. En la próstata normal los andrógenos circulantes actúan sobre las células musculares lisas estromales (RA positivas) para mantener la diferenciación y quiescencia del epitelio³⁴³. La rápida regresión que sufre el epitelio prostático tras la castración se asocia a una progresiva desdiferenciación de las fibras musculares lisas hacia fibroblastos relativamente indiferenciados. Éstos responden a bajos niveles de andrógenos (a través del RA) promoviendo la mitogénesis del epitelio. A su vez, el epitelio actúa facilitando la re-diferenciación de estos fibroblastos en fibras de músculo liso. Sin embargo, se piensa que en el cáncer de próstata, el epitelio neoplásico alteraría estas interacciones estroma-epitelio que provocarían cambios epigenéticos en el estroma y la proliferación celular incontrolada en el epitelio^{342,343}.

La sobreexpresión del receptor de andrógenos ha sido relacionada con la aparición de hormono-resistencia en el transcurso evolutivo de la enfermedad^{341,342,344-346}. Se han postulado varios mecanismos por los que la expresión del RA podría contribuir a este hecho, como por ejemplo la amplificación del gen del receptor (este gen rara vez aparece amplificado en el cáncer de próstata primario, pero sí lo hace en el 30% de los tumores hormono-resistentes^{300,341}.) También la existencia de frecuentes mutaciones del RA, observadas en tumores en los que la terapia hormonal hubo fracasado³⁴⁷⁻³⁴⁹ y la activación del RA producida por citocinas y diferentes factores de crecimiento.

La ausencia de asociación entre la expresión del receptor de andrógenos y las proteasas estudiadas en nuestro trabajo sugiere que éstas siguen vías reguladoras independientes del influjo androgénico.

6. SOBREPRESIÓN DEL ANTÍGENO Ki-67

Hemos comentado con anterioridad que el antígeno Ki-67 se encuentra presente a lo largo del ciclo celular (fases G1, S, G2 y M), pero no en la fase de quiescencia (G0) o en la G1 (etapa precoz). Esta es una de las razones por las que se considera su expresión como marcador de proliferación celular y ha sido asociada frecuentemente a mayor agresividad biológica y pronóstico desfavorable, en diferentes tumores humanos^{304,305,350}.

En el presente trabajo hemos estudiado la expresión del antígeno Ki-67 por medio del anticuerpo monoclonal MIB-1. Se trata de un método válido ya que este anticuerpo (monoclonal frente a porciones recombinantes del antígeno Ki-67), presenta un patrón de tinción nuclear en material parafinado idéntico al del anticuerpo monoclonal Ki-67 en material fresco³⁵¹.

Nosotros hemos observado positividad nuclear en el epitelio del tejido prostático neoplásico, siendo prácticamente negativa en la próstata normal y en la hiperplasia benigna. Estos datos concuerdan con los que de forma uniforme se han ido publicando en la literatura.

Rudolph y colaboradores³⁵² cuantificaron la expresión del antígeno en muestras de tejido prostático normal y tumoral. Empleando el recuento directo de células positivas en campos de gran aumento, observaron que los niveles más bajos de expresión se encontraron en la próstata normal e hiperplásica, y los mayores porcentajes de células que exhibieron positividad para el antígeno correspondieron a las muestras tumorales.

En la misma línea se encuentran los trabajos publicados por Lima³⁵³ y Helpap³⁵⁴. Al estudiar la cinética celular en diferentes patologías de la glándula prostática, comprobaron que la actividad proliferativa (evaluada por la expresión de Ki-67) se encontraba elevada en las áreas de inflamación y metaplasia, mostrando sus máximos niveles de expresión en los adenocarcinomas de alto grado. Entidades como la hiperplasia benigna, la hiperplasia

adenomiomatosa presentaron muy bajos niveles de expresión, mientras que el PIN de alto grado presentó un nivel intermedio.

La expresión del antígeno Ki-67 ha sido estudiada en el cáncer de próstata metastásico, con resultados interesantes. Bryden y colaboradores³⁵⁵ analizaron la expresión del antígeno en muestras de biopsias de metástasis óseas, observando que el índice de proliferación era similar al de las lesiones primarias, pero no encontraron relación alguna con el grado tumoral. Cheng y colaboradores³⁵⁶ observaron que la sobreexpresión de Ki-67 en los ganglios metastásicos locorregionales de pacientes afectos de cáncer de próstata, correlacionaba con el grado de Gleason y que además se comportaba como valor predictivo independiente de la supervivencia libre de progresión de estos pacientes.

También se ha estudiado la utilidad clínica de la expresión de Ki-67 en las biopsias diagnósticas preoperatorias con resultados dispares. Ojea Calvo y colaboradores³⁰⁷ observaron que esta expresión no resultaba tan eficaz como el grado de Gleason, el nivel de PSA preoperatorio y el estadio tumoral, para predecir la recidiva bioquímica de la enfermedad tras la prostatectomía radical.

Por el contrario Bubendorf y colaboradores³⁰⁶ comprobaron que la sobreexpresión del antígeno correlacionaba fuertemente con el grado de diferenciación, con un aumento continuo de la actividad proliferativa desde los tumores de bajo grado a los de alto, siendo esta sobreexpresión el único parámetro con valor predictivo de supervivencia tumor-específica en el análisis multivariante.

La posible utilidad clínica de la expresión de Ki-67 en cuanto a su valor pronóstico se refiere se puede argumentar sobre los resultados obtenidos por Zudaire y colaboradores³⁰⁸. Estos autores estudiaron la expresión del antígeno en piezas de prostatectomía radical y observaron que se encontraba directamente relacionada con el estadio tumoral y que en el análisis multivariado, se comportaba como predictor independiente de supervivencia libre de recidiva bioquímica, junto el grado de Gleason y el valor del PSA preoperatorio.

Parecidos resultados son los obtenidos por Revelos y colaboradores³⁵⁷, que al realizar un estudio metodológicamente similar al anterior, comprobaron que la expresión de Ki-67 junto

con la presencia de ganglios linfáticos metastásicos podrían ser predictores de fracaso bioquímico tras la prostatectomía radical.

Takahiro Inoue y colaboradores³⁵⁸ elaboraron una matriz de tejidos, compuesta por 52 casos de cáncer de próstata y analizaron la expresión del antígeno Ki-67, observando que esta expresión, junto con el estado de los márgenes de resección quirúrgicos, se comportó como factor predictivos independientes de supervivencia libre de recidiva.

Nuestro estudio no ha podido reproducir estos resultados. Pensamos que nuestro análisis estadístico para este marcador no ha sido lo suficientemente potente como para detectar diferencias significativas, en parte por el desequilibrio de casos en las categorías dicotomizadas (sobrexpresión / no sobreexpresión). El punto de corte elegido ha sido subjetivo, debido a la ausencia de acuerdo general en este sentido. Además, el número de eventos a analizar (número de casos que presentaron progresión de la enfermedad) fue relativamente escaso en nuestra serie. Es probable que un mayor número de casos hubiera aumentado la potencia del estudio.

7. CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados de este trabajo de investigación permiten deducir que las proteasas estudiadas se encuentran sobreexpresadas en las lesiones preinvasivas y en el cáncer de próstata, y por lo tanto, que podrían desempeñar un papel relevante en los mecanismos de invasión, progresión y metástasis de esta enfermedad.

Entre las aportaciones más interesantes de nuestro estudio se encuentran los resultados de la CB en el estroma y su valor predictivo en el modelo creado. Destaca la correlación de la sobreexpresión de la CB en este compartimento y parámetros tradicionales como el grado de Gleason y la progresión, lo que indica la importancia de la investigación de los mecanismos metabólicos que ocurren en el estroma del huésped, y su relación con los epitelios tumorales.

La coincidencia de sobreexpresión de las catepsinas B y L en el cáncer de próstata y su diferente significado al correlacionarlas con los parámetros clínico-patológicos, tanto en el compartimento epitelial como en el estromal, indican una gran complejidad de interacciones y modulaciones, probablemente trascendentes para la evolución de esta neoplasia.

Sin embargo, serán necesarios estudios adicionales que evalúen series amplias de casos con criterios clinico-patológicos homogéneos y seguimientos prolongados para dilucidar el papel exacto de estas proteasas en la carcinogénesis prostática y su eventual utilidad clínica.

CONCLUSIONES

- 1) La catepsina B se expresa en lesiones preinvasivas y en el cáncer de próstata. La asociación entre su sobreexpresión y un elevado grado de Gleason, permiten suponer que esta proteasa es secretada profusamente por los tumores pobremente diferenciados, confiriendo mayor agresividad a los mismos.

- 2) La sobreexpresión de CB en el compartimiento epitelial podría estar relacionada con la progresión de la enfermedad, sin embargo, su sobreexpresión en el estroma se comporta como un factor independiente de buen pronóstico, lo que puede denotar una función de defensa a la invasión tumoral en este compartimento.

- 3) La catepsina L se expresa en el cáncer de próstata. Parece ser que su sobreexpresión podría conferir mayor agresividad a los tumores pobremente diferenciados. Su positividad en el endotelio vascular sugiere su participación en los fenómenos de angiogénesis

- 4) La hepsina se expresa en el cáncer de próstata, pudiendo estar relacionada en la transformación maligna de la próstata. Su relación con el antígeno Ki-67 podría indicar una mayor actividad proteolítica en tumores de alto índice de proliferación.

- 5) La maspina se expresa fundamentalmente en las células basales del epitelio prostático normal, sugiriendo un papel en los mecanismos de recambio celular y/o interacción con la matriz extracelular.

- 6) El receptor de andrógenos se encuentra sobreexpresado en el cáncer de próstata pero no se correlaciona con las proteasas de nuestro estudio, sugiriendo que la intervención de las mismas en el desarrollo de la neoplasia prostática no depende necesariamente del estímulo androgénico.

- 7) La expresión del antígeno Ki-67 (MIB-1) se encuentra elevada en el cáncer de próstata, no siendo así en el epitelio no neoplásico, observación que puede apoyar la hipótesis de su participación en la carcinogénesis prostática

BIBLIOGRAFÍA

1. Parkin, D. M.: Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*, **2**: 533, 2001
2. Hankey, B. F., Feuer, E. J., Clegg, L. X. et al.: Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer--part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J Natl Cancer Inst*, **91**: 1017, 1999
3. Clegg, L. X., Li, F. P., Hankey, B. F. et al.: Cancer survival among US whites and minorities: a SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) Program population-based study. *Arch Intern Med*, **162**: 1985, 2002
4. Hankey, B. F., Feuer, E. J., Clegg, L. X. et al.: Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer--part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J Natl Cancer Inst*, **91**: 1017, 1999
5. Landis, S. H., Murray, T., Bolden, S. et al.: Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin*, **49**: 8, 1999
6. Merrill, R. M. and Stephenson, R. A.: Trends in mortality rates in patients with prostate cancer during the era of prostate specific antigen screening. *J Urol*, **163**: 503, 2000
7. Landis, S. H., Murray, T., Bolden, S. et al.: Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin*, **49**: 8, 1999
8. Otero M, Fernandez A, and Gil-Fabra J. Epidemiología descriptiva y analítica en oncología urológica. Tema Monográfico AEU.Santander 1996 . 1996.
9. Haas, G. P. and Sakr, W. A.: Epidemiology of prostate cancer. *CA Cancer J Clin*, **47**: 273, 1997
10. Herranz, A. F., Arias, F. F., Arrizabalaga, M. M. et al.: [Prostate cancer in the Community of Madrid in the year 2000. IV. Treatment]. *Actas Urol Esp*, **27**: 418, 2003
11. Shimizu, H., Ross, R. K., Bernstein, L. et al.: Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer*, **63**: 963, 1991
12. Tyczynski, J., Parkin, D., Zatonski, W. et al.: Cancer mortality among Polish migrants to France. *Bull Cancer*, **79**: 789, 1992
13. : Review of current data impacting early detection guidelines for prostate cancer. Proceedings of an American Cancer Society workshop. Phoenix, Arizona, March 10-11, 1997. *Cancer*, **80**: 1808, 1997
14. Scardino, P. T.: Early detection of prostate cancer. *Urol Clin North Am*, **16**: 635, 1989

15. Akazaki, K. and Stemmerman, G. N.: Comparative study of latent carcinoma of the prostate among Japanese in Japan and Hawaii. *J Natl Cancer Inst*, **50**: 1137, 1973
16. Dhom, G.: Epidemiologic aspects of latent and clinically manifest carcinoma of the prostate. *J Cancer Res Clin Oncol*, **106**: 210, 1983
17. Haas, G. P. and Sakr, W. A.: Epidemiology of prostate cancer. *CA Cancer J Clin*, **47**: 273, 1997
18. Carter, H. B., Piantadosi, S., and Isaacs, J. T.: Clinical evidence for and implications of the multistep development of prostate cancer. *J Urol*, **143**: 742, 1990
19. Pienta, K. J. and Esper, P. S.: Risk factors for prostate cancer. *Ann Intern Med*, **118**: 793, 1993
20. Montie, J. E.: Prognostic factors for renal cell carcinoma. *J Urol*, **152**: 1397, 1994
21. Hankey, B. F., Feuer, E. J., Clegg, L. X. et al.: Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer--part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J Natl Cancer Inst*, **91**: 1017, 1999
22. Lowe, B. A. and Listrom, M. B.: Incidental carcinoma of the prostate: an analysis of the predictors of progression. *J Urol*, **140**: 1340, 1988
23. Hankey, B. F., Feuer, E. J., Clegg, L. X. et al.: Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer--part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J Natl Cancer Inst*, **91**: 1017, 1999
24. Mebane, C., Gibbs, T., and Horm, J.: Current status of prostate cancer in North American black males. *J Natl Med Assoc*, **82**: 782, 1990
25. Ross, R. K., Shimizu, H., Paganini-Hill, A. et al.: Case-control studies of prostate cancer in blacks and whites in southern California. *J Natl Cancer Inst*, **78**: 869, 1987
26. Ogunlewe, J. O. and Osegbe, D. N.: Zinc and cadmium concentrations in indigenous blacks with normal, hypertrophic, and malignant prostate. *Cancer*, **63**: 1388, 1989
27. Osegbe, D. N. and Ogunlewe, J. O.: Androgen concentration in blacks with benign and malignant prostatic disease. *J Urol*, **140**: 160, 1988
28. Yu, H., Harris, R. E., Gao, Y. T. et al.: Comparative epidemiology of cancers of the colon, rectum, prostate and breast in Shanghai, China versus the United States. *Int J Epidemiol*, **20**: 76, 1991

29. Key, T. J.: Prostate cancer: rates in Europe, dietary hypotheses, and plans for EPIC. *IARC Sci Publ*, **156**: 197, 2002
30. Key, T. J., Silcocks, P. B., Davey, G. K. et al.: A case-control study of diet and prostate cancer. *Br J Cancer*, **76**: 678, 1997
31. Key, T.: Micronutrients and cancer aetiology: the epidemiological evidence. *Proc Nutr Soc*, **53**: 605, 1994
32. Wynder, E. L., Rose, D. P., and Cohen, L. A.: Nutrition and prostate cancer: a proposal for dietary intervention. *Nutr Cancer*, **22**: 1, 1994
33. West, D. W., Slattery, M. L., Robison, L. M. et al.: Adult dietary intake and prostate cancer risk in Utah: a case-control study with special emphasis on aggressive tumors. *Cancer Causes Control*, **2**: 85, 1991
34. Whittemore, A. S., Kolonel, L. N., Wu, A. H. et al.: Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst*, **87**: 652, 1995
35. Hirayama, T.: Epidemiology of prostate cancer with special reference to the role of diet. *Natl Cancer Inst Monogr*, 149, 1979
36. Berg, J. W.: Nutrition and cancer. *Semin Oncol*, **3**: 17, 1976
37. Siddiqui I A, Adhami VM, Saleen M, and Mukhtar Hasan. Beneficial effects of tea and its polyphenols against prostate cancer. *Molecular Nutrition and Food Research* 50[2], 130-143. 2006.
38. Veierod, M. B., Laake, P., and Thelle, D. S.: Dietary fat intake and risk of prostate cancer: a prospective study of 25,708 Norwegian men. *Int J Cancer*, **73**: 634, 1997
39. Ramon, J. M., Bou, R., Romea, S. et al.: Dietary fat intake and prostate cancer risk: a case-control study in Spain. *Cancer Causes Control*, **11**: 679, 2000
40. Kolonel, L. N., Nomura, A. M., and Cooney, R. V.: Dietary fat and prostate cancer: current status. *J Natl Cancer Inst*, **91**: 414, 1999
41. Le Marchand, L., Kolonel, L. N., Wilkens, L. R. et al.: Animal fat consumption and prostate cancer: a prospective study in Hawaii. *Epidemiology*, **5**: 276, 1994
42. Kolonel, L. N.: Nutrition and prostate cancer. *Cancer Causes Control*, **7**: 83, 1996
43. Rose, D. P.: Dietary fatty acids and prevention of hormone-responsive cancer. *Proc Soc Exp Biol Med*, **216**: 224, 1997
44. Gann, P. H., Hennekens, C. H., Sacks, F. M. et al.: Prospective study of plasma fatty acids and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, **86**: 281, 1994

45. Newcomer, L. M., King, I. B., Wicklund, K. G. et al.: The association of fatty acids with prostate cancer risk. *Prostate*, **47**: 262, 2001
46. Kolonel, L. N., Nomura, A. M., and Cooney, R. V.: Dietary fat and prostate cancer: current status. *J Natl Cancer Inst*, **91**: 414, 1999
47. Ghosh, J. and Myers, C. E.: Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*, **235**: 418, 1997
48. Mettlin, C., Selenskas, S., Natarajan, N. et al.: Beta-carotene and animal fats and their relationship to prostate cancer risk. A case-control study. *Cancer*, **64**: 605, 1989
49. Willett, W. C. and Hunter, D. J.: Vitamin A and cancers of the breast, large bowel, and prostate: epidemiologic evidence. *Nutr Rev*, **52**: S53, 1994
50. Kristal, A. R.: Vitamin A, retinoids and carotenoids as chemopreventive agents for prostate cancer. *J Urol*, **171**: S54, 2004
51. Heinonen, O. P., Albanes, D., Virtamo, J. et al.: Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial. *J Natl Cancer Inst*, **90**: 440, 1998
52. Schwartz, G. G. and Hulka, B. S.: Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hypothesis). *Anticancer Res*, **10**: 1307, 1990
53. Hanchette, C. L. and Schwartz, G. G.: Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation. *Cancer*, **70**: 2861, 1992
54. Miller, G. J.: Vitamin D and prostate cancer: biologic interactions and clinical potentials. *Cancer Metastasis Rev*, **17**: 353, 1998
55. Schwartz, G. G., Oeler, T. A., Uskokovic, M. R. et al.: Human prostate cancer cells: inhibition of proliferation by vitamin D analogs. *Anticancer Res*, **14**: 1077, 1994
56. Peehl, D. M.: Vitamin D and prostate cancer risk. *Eur Urol*, **35**: 392, 1999
57. Chan, J. M. and Giovannucci, E. L.: Dairy products, calcium, and vitamin D and risk of prostate cancer. *Epidemiol Rev*, **23**: 87, 2001
58. Giovannucci, E.: A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*, **227**: 852, 2002
59. Giovannucci, E., Rimm, E. B., Liu, Y. et al.: A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, **94**: 391, 2002
60. Giovannucci, E. and Clinton, S. K.: Tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Proc Soc Exp Biol Med*, **218**: 129, 1998

61. Gann, P. H., Ma, J., Giovannucci, E. et al.: Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res*, **59**: 1225, 1999
62. Etminan, M., Takkouche, B., and Caamano-Isorna, F.: The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **13**: 340, 2004
63. Clinton, S. K., Emenhiser, C., Schwartz, S. J. et al.: cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **5**: 823, 1996
64. Agarwal, S. and Rao, A. V.: Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ*, **163**: 739, 2000
65. Clark, L. C., Dalkin, B., Krongrad, A. et al.: Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. *Br J Urol*, **81**: 730, 1998
66. Sharma-Wagner, S., Chokkalingam, A. P., Malke, H. S. et al.: Occupation and prostate cancer risk in Sweden. *J Occup Environ Med*, **42**: 517, 2000
67. Waalkes, M. P. and Rehm, S.: Cadmium and prostate cancer. *J Toxicol Environ Health*, **43**: 251, 1994
68. Bako, G., Smith, E. S., Hanson, J. et al.: The geographical distribution of high cadmium concentrations in the environment and prostate cancer in Alberta. *Can J Public Health*, **73**: 92, 1982
69. Ogunlewe, J. O. and Osegbe, D. N.: Zinc and cadmium concentrations in indigenous blacks with normal, hypertrophic, and malignant prostate. *Cancer*, **63**: 1388, 1989
70. Elghany, N. A., Schumacher, M. C., Slattery, M. L. et al.: Occupation, cadmium exposure, and prostate cancer. *Epidemiology*, **1**: 107, 1990
71. Breslow, R. A. and Weed, D. L.: Review of epidemiologic studies of alcohol and prostate cancer: 1971-1996. *Nutr Cancer*, **30**: 1, 1998
72. Breslow, R. A., Wideroff, L., Graubard, B. I. et al.: Alcohol and prostate cancer in the NHANES I epidemiologic follow-up study. First National Health and Nutrition Examination Survey of the United States. *Ann Epidemiol*, **9**: 254, 1999
73. Jain, M. G., Hislop, G. T., Howe, G. R. et al.: Alcohol and other beverage use and prostate cancer risk among Canadian men. *Int J Cancer*, **78**: 707, 1998
74. Sharpe, C. R. and Siemiatycki, J.: Consumption of non-alcoholic beverages and prostate cancer risk. *Eur J Cancer Prev*, **11**: 497, 2002

75. Kuper, H., Boffetta, P., and Adami, H. O.: Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *J Intern Med*, **252**: 206, 2002
76. Hsing, A. W., McLaughlin, J. K., Schuman, L. M. et al.: Diet, tobacco use, and fatal prostate cancer: results from the Lutheran Brotherhood Cohort Study. *Cancer Res*, **50**: 6836, 1990
77. Hiatt, R. A., Armstrong, M. A., Klatsky, A. L. et al.: Alcohol consumption, smoking, and other risk factors and prostate cancer in a large health plan cohort in California (United States). *Cancer Causes Control*, **5**: 66, 1994
78. Daniell, H. W.: A worse prognosis for smokers with prostate cancer. *J Urol*, **154**: 153, 1995
79. Levi, F. and La Vecchia, C.: Tobacco smoking and prostate cancer: time for an appraisal. *Ann Oncol*, **12**: 733, 2001
80. Carter, B. S., Steinberg, G. D., Beaty, T. H. et al.: Familial risk factors for prostate cancer. *Cancer Surv*, **11**: 5, 1991
81. Bratt, O., Kristoffersson, U., Lundgren, R. et al.: Familial and hereditary prostate cancer in southern Sweden. A population-based case-control study. *Eur J Cancer*, **35**: 272, 1999
82. Damber, J. E.: Hereditary prostate cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, **203**: 25, 1999
83. Steinberg, G. D., Carter, B. S., Beaty, T. H. et al.: Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate*, **17**: 337, 1990
84. Carter, B. S., Beaty, T. H., Steinberg, G. D. et al.: Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**: 3367, 1992
85. Kupelian, P. A., Klein, E. A., Witte, J. S. et al.: Familial prostate cancer: a different disease? *J Urol*, **158**: 2197, 1997
86. Rokman, A., Ikonen, T., Seppala, E. H. et al.: Germline alterations of the RNASEL gene, a candidate HPC1 gene at 1q25, in patients and families with prostate cancer. *Am J Hum Genet*, **70**: 1299, 2002
87. Walsh, P. C.: Early age at diagnosis in families providing evidence of linkage to the hereditary prostate cancer locus (HPC1) on chromosome 1. *J Urol*, **160**: 265, 1998
88. Gronberg, H., Isaacs, S. D., Smith, J. R. et al.: Characteristics of prostate cancer in families potentially linked to the hereditary prostate cancer 1 (HPC1) locus. *JAMA*, **278**: 1251, 1997
89. Keetch, D. W., Humphrey, P. A., Smith, D. S. et al.: Clinical and pathological features of hereditary prostate cancer. *J Urol*, **155**: 1841, 1996

90. Bastacky, S. I., Wojno, K. J., Walsh, P. C. et al.: Pathological features of hereditary prostate cancer. *J Urol*, **153**: 987, 1995
91. Joseph, I. B., Nelson, J. B., Denmeade, S. R. et al.: Androgens regulate vascular endothelial growth factor content in normal and malignant prostatic tissue. *Clin Cancer Res*, **3**: 2507, 1997
92. Kyprianou, N.: Apoptosis: therapeutic significance in the treatment of androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer. *World J Urol*, **12**: 299, 1994
93. Habib, F. K., Hammond, G. L., Lee, I. R. et al.: Metal-androgen interrelationships in carcinoma and hyperplasia of the human prostate. *J Endocrinol*, **71**: 133, 1976
94. Ross, R. K., Pike, M. C., Coetzee, G. A. et al.: Androgen metabolism and prostate cancer: establishing a model of genetic susceptibility. *Cancer Res*, **58**: 4497, 1998
95. Ross, R. K. and Henderson, B. E.: Do diet and androgens alter prostate cancer risk via a common etiologic pathway? *J Natl Cancer Inst*, **86**: 252, 1994
96. Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E. B. et al.: A prospective cohort study of vasectomy and prostate cancer in US men. *JAMA*, **269**: 873, 1993
97. Giovannucci, E., Tosteson, T. D., Speizer, F. E. et al.: A retrospective cohort study of vasectomy and prostate cancer in US men. *JAMA*, **269**: 878, 1993
98. Hayes, R. B., Pottern, L. M., Greenberg, R. et al.: Vasectomy and prostate cancer in US blacks and whites. *Am J Epidemiol*, **137**: 263, 1993
99. Howards, S. S. and Peterson, H. B.: Vasectomy and prostate cancer. Chance, bias, or a causal relationship? *JAMA*, **269**: 913, 1993
100. Mettlin, C., Natarajan, N., and Huben, R.: Vasectomy and prostate cancer risk. *Am J Epidemiol*, **132**: 1056, 1990
101. Newell, G. R., Fueger, J. J., Spitz, M. R. et al.: A case-control study of prostate cancer. *Am J Epidemiol*, **130**: 395, 1989
102. Howards, S. S. and Peterson, H. B.: Vasectomy and prostate cancer. Chance, bias, or a causal relationship? *JAMA*, **269**: 913, 1993
103. Guess, H. A.: Is vasectomy a risk factor for prostate cancer? *Eur J Cancer*, **29A**: 1055, 1993
104. Armenian, H. K., Lilienfeld, A. M., Diamond, E. L. et al.: Relation between benign prostatic hyperplasia and cancer of the prostate. A prospective and retrospective study. *Lancet*, **2**: 115, 1974

105. Greenwald, P., Kirmss, V., Polan, A. K. et al.: Cancer of the prostate among men with benign prostatic hyperplasia. *J Natl Cancer Inst*, **53**: 335, 1974
106. Giovannucci, E., Rimm, E. B., Stampfer, M. J. et al.: Diabetes mellitus and risk of prostate cancer (United States). *Cancer Causes Control*, **9**: 3, 1998
107. Rosenberg, D. J., Neugut, A. I., Ahsan, H. et al.: Diabetes mellitus and the risk of prostate cancer. *Cancer Invest*, **20**: 157, 2002
108. Glantz, G. M.: Cirrhosis and Carcinoma of the Prostate Gland. *J Urol*, **91**: 291, 1964
109. Chopra, I. J., Tulchinsky, D., and Greenway, F. L.: Estrogen-androgen imbalance in hepatic cirrhosis. Studies in 13 male patients. *Ann Intern Med*, **79**: 198, 1973
110. Gann, P. H.: Interpreting recent trends in prostate cancer incidence and mortality. *Epidemiology*, **8**: 117, 1997
111. Smith, D. S. and Catalona, W. J.: The nature of prostate cancer detected through prostate specific antigen based screening. *J Urol*, **152**: 1732, 1994
112. Stephenson RA and Stanford JL. Population-based prostate cancer trends in the United States: Patterns of change in the era of prostatic-specific antigen. *World J.Urol*. 6[15], 331-3335. 1997.
113. Introini, C. and Puppo, P.: [Prostate biopsy: assessment of current indications and techniques]. *Arch Ital Urol Androl*, **72**: 150, 2000
114. Catalona, W. J., Richie, J. P., Ahmann, F. R. et al.: Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol*, **151**: 1283, 1994
115. Gerber, G. S., Goldberg, R., and Chodak, G. W.: Local staging of prostate cancer by tumor volume, prostate-specific antigen, and transrectal ultrasound. *Urology*, **40**: 311, 1992
116. Flanigan, R. C., Catalona, W. J., Richie, J. P. et al.: Accuracy of digital rectal examination and transrectal ultrasonography in localizing prostate cancer. *J Urol*, **152**: 1506, 1994
117. Carvalhal, G. F., Smith, D. S., Mager, D. E. et al.: Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng./ml. or less. *J Urol*, **161**: 835, 1999
118. Catalona, W. J., Richie, J. P., Ahmann, F. R. et al.: Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol*, **151**: 1283, 1994

119. Watanabe, H., Kato, H., Kato, T. et al.: [Diagnostic application of ultrasonotomography to the prostate]. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*, **59**: 273, 1968
120. Mayayo Dehesa T, Resel L, and Fernández JI. Ecografía transrectal y biopsia prostática ecodirigida en el carcinoma prostático. *Tratado de Urología Oncológica*, 737-757. 2003. ED. Sanidad y Ediciones SL.
121. Scardino, P. T.: Transrectal ultrasound in management of prostate cancer. *Urology*, **33**: 27, 1989
122. McNeal, J. E., Villers, A. A., Redwine, E. A. et al.: Capsular penetration in prostate cancer. Significance for natural history and treatment. *Am J Surg Pathol*, **14**: 240, 1990
123. Do, T., Dave, G., Parker, R. et al.: Serum PSA evaluations during salvage radiotherapy for post-prostatectomy biochemical failures as prognosticators for treatment outcomes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **50**: 1220, 2001
124. Lilja, H.: Biology of prostate-specific antigen. *Urology*, **62**: 27, 2003
125. McGee, R. S. and Herr, J. C.: Human seminal vesicle-specific antigen is a substrate for prostate-specific antigen (or P-30). *Biol Reprod*, **39**: 499, 1988
126. Filella, X., Molina, R., Alcover, J. et al.: Detection of nonprostatic PSA in serum and nonserum samples from women. *Int J Cancer*, **68**: 424, 1996
127. Catalona, W. J.: Screening for prostate cancer: enthusiasm. *Urology*, **42**: 113, 1993
128. Catalona, W. J., Hudson, M. A., Scardino, P. T. et al.: Selection of optimal prostate specific antigen cutoffs for early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves. *J Urol*, **152**: 2037, 1994
129. Catalona, W. J., Ramos, C. G., Carvalhal, G. F. et al.: Lowering PSA cutoffs to enhance detection of curable prostate cancer. *Urology*, **55**: 791, 2000
130. Ornstein, D. K., Dahut, W. L., Liotta, L. A. et al.: Review of AACR meeting: new research approaches in the prevention and cure of prostate cancer, 2-6 December 1998, Indian Wells, CA. *Biochim Biophys Acta*, **1424**: R11, 1999
131. Cooner, W. H., Mosley, B. R., Rutherford, C. L., Jr. et al.: Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. *J Urol*, **143**: 1146, 1990
132. Catalona, W. J., Richie, J. P., Ahmann, F. R. et al.: Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of

- prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol*, **151**: 1283, 1994
133. Filella, X., Alcover, J., Molina, R. et al.: Free and total PSA in the diagnosis of prostate cancer. *Tumour Biol*, **18**: 332, 1997
 134. Stenman, U. H., Hakama, M., Knekt, P. et al.: Serum concentrations of prostate specific antigen and its complex with alpha 1-antichymotrypsin before diagnosis of prostate cancer. *Lancet*, **344**: 1594, 1994
 135. Catalona, W. J., Southwick, P. C., Slawin, K. M. et al.: Comparison of percent free PSA, PSA density, and age-specific PSA cutoffs for prostate cancer detection and staging. *Urology*, **56**: 255, 2000
 136. Alcover, J., Filella, J., Vendrell, J. R. et al.: [The diagnostic utility of PSA density]. *Actas Urol Esp*, **19**: 192, 1995
 137. Catalona, W. J., Southwick, P. C., Slawin, K. M. et al.: Comparison of percent free PSA, PSA density, and age-specific PSA cutoffs for prostate cancer detection and staging. *Urology*, **56**: 255, 2000
 138. Zlotta, A. R., Djavan, B., Marberger, M. et al.: Prostate specific antigen density of the transition zone: a new effective parameter for prostate cancer prediction. *J Urol*, **157**: 1315, 1997
 139. Diaz, F., Morell, M., and Rojo, G.: Usefulness of PSA density and PSA excess in the differential diagnosis between prostate cancer and benign prostatic hypertrophy. *Int J Biol Markers*, **11**: 12, 1996
 140. Gustafsson, O., Mansour, E., Norming, U. et al.: Prostate-specific antigen (PSA), PSA density and age-adjusted PSA reference values in screening for prostate cancer--a study of a randomly selected population of 2,400 men. *Scand J Urol Nephrol*, **32**: 373, 1998
 141. Rahardjo, D., Kamil, S. T., and Pakasi, L. S.: Rationale for using serum prostate-specific antigen (PSA) level and PSA density (PSAD) to detect prostatic malignancy in a country with low prostate cancer incidence. *Gan To Kagaku Ryoho*, **27 Suppl 2**: 563, 2000
 142. Yu, H. J. and Lai, M. K.: The usefulness of prostate-specific antigen (PSA) density in patients with intermediate serum PSA level in a country with low incidence of prostate cancer. *Urology*, **51**: 125, 1998
 143. Carter, H. B., Morrell, C. H., Pearson, J. D. et al.: Estimation of prostatic growth using serial prostate-specific antigen measurements in men with and without prostate disease. *Cancer Res*, **52**: 3323, 1992
 144. Oesterling, J. E., Jacobsen, S. J., Chute, C. G. et al.: Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA*, **270**: 860, 1993

145. Brawer, M. K., Meyer, G. E., Letran, J. L. et al.: Measurement of complexed PSA improves specificity for early detection of prostate cancer. *Urology*, **52**: 372, 1998
146. Filella, X., Alcover, J., Corral, J. M. et al.: Free to complexed PSA ratio in differentiating benign prostate hyperplasia from prostate cancer. *Anticancer Res*, **21**: 3717, 2001
147. Jung, K., Elgeti, U., Lein, M. et al.: Ratio of free or complexed prostate-specific antigen (PSA) to total PSA: which ratio improves differentiation between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? *Clin Chem*, **46**: 55, 2000
148. Martin, B., Cheli, C. D., Lifsey, D. et al.: Complexed PSA performance for prostate cancer detection in an African-American population. *Urology*, **62**: 835, 2003
149. Bostwick, D. G.: Progression of prostatic intraepithelial neoplasia to early invasive adenocarcinoma. *Eur Urol*, **30**: 145, 1996
150. Bostwick, D. G. and Montironi, R.: Prostatic intraepithelial neoplasia and the origins of prostatic carcinoma. *Pathol Res Pract*, **191**: 828, 1995
151. McNeal, J. E.: Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol*, **12**: 619, 1988
152. Brawer, M. K., Peehl, D. M., Stamey, T. A. et al.: Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate. *Cancer Res*, **45**: 3663, 1985
153. Bostwick, D. G. and Montironi, R.: Prostatic intraepithelial neoplasia and the origins of prostatic carcinoma. *Pathol Res Pract*, **191**: 828, 1995
154. Wojno, K. J. and Epstein, J. I.: The utility of basal cell-specific anti-cytokeratin antibody (34 beta E12) in the diagnosis of prostate cancer. A review of 228 cases. *Am J Surg Pathol*, **19**: 251, 1995
155. Brawer, M. K., Bigler, S. A., Sohlberg, O. E. et al.: Significance of prostatic intraepithelial neoplasia on prostate needle biopsy. *Urology*, **38**: 103, 1991
156. Keetch, D. W., Humphrey, P., Stahl, D. et al.: Morphometric analysis and clinical followup of isolated prostatic intraepithelial neoplasia in needle biopsy of the prostate. *J Urol*, **154**: 347, 1995
157. Rosai and Ackermann. *Surgical Pathology 1*. Mosby.
158. Randolph TL, Amin MB, Ro JY, and Ayala AG. Histologic variants of adenocarcinoma and other carcinomas of the prostate: pathologic criteria and clinical significance. *Mod.Pathol.* 10, 612-629. 1997.

159. Stamey, T. A., Kabalin, J. N., McNeal, J. E. et al.: Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. II. Radical prostatectomy treated patients. *J Urol*, **141**: 1076, 1989
160. Oesterling, J. E., Martin, S. K., Bergstralh, E. J. et al.: The use of prostate-specific antigen in staging patients with newly diagnosed prostate cancer. *JAMA*, **269**: 57, 1993
161. Brawn, P.: Histologic features of metastatic prostate cancer. *Hum Pathol*, **23**: 267, 1992
162. Gaeta, J. F. and Asirwatham, J. E.: Prostate cancer grading: the NPCP system. *Semin Urol*, **1**: 193, 1983
163. Anderson, D. R., Patil, S., Kamina, A. et al.: Validation of a staging system for evaluating prognosis in prostate cancer. *Conn Med*, **64**: 459, 2000
164. Gleason, D. F.: Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep*, **50**: 125, 1966
165. Gleason, D. F.: Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol*, **23**: 273, 1992
166. Allsbrook, W. C., Jr., Mangold, K. A., Johnson, M. H. et al.: Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma: general pathologist. *Hum Pathol*, **32**: 81, 2001
167. Bostwick DG and Foster CS. Predictive factors in prostate cancer: current concepts from the 1999 College of American Pathologists Conference on Solid Tumors Prognostic Factors and the 1999 World Health Organization Second International Consultation on Prostate Cancer. *Sem Urol Oncol* 17, 222-272. 1995.
168. Epstein, J. I., Pizov, G., and Walsh, P. C.: Correlation of pathologic findings with progression after radical retropubic prostatectomy. *Cancer*, **71**: 3582, 1993
169. Blute, M. L., Bergstralh, E. J., Iocca, A. et al.: Use of Gleason score, prostate specific antigen, seminal vesicle and margin status to predict biochemical failure after radical prostatectomy. *J Urol*, **165**: 119, 2001
170. Egab AJM and Bostwick DG. *Prediction of extraprostatic extension of prostate cancer based on needle biopsy findings: perineural invasion lacks significance on multivariate analysis.* *Am J Surg Pathol* 21, 1496-1500. 1997.
171. Baisden BL, Kahane H, and Epstein JI. Perineural invasion, mucinous fibroplasia and glomerulations. *Am J Surg Pathol* 23, 918-924. 1999.

172. Sebo, T. J., Cheville, J. C., Riehle, D. L. et al.: Perineural invasion and MIB-1 positivity in addition to Gleason score are significant preoperative predictors of progression after radical retropubic prostatectomy for prostate cancer. *Am J Surg Pathol*, **26**: 431, 2002
173. D'Amico AV, Wu Y, Chen MH, Nash M, Renshaw AA, and Richie JP. Perineural invasion as a predictor of biochemical outcome following radical prostatectomy for select men with clinically localized prostate cancer. *J Urol* 165, 126-129. 2001.
174. Di Blasio, C. J., Rhee, A. C., Cho, D. et al.: Predicting clinical end points: treatment nomograms in prostate cancer. *Semin Oncol*, **30**: 567, 2003
175. Graefen, M., Karakiewicz, P. I., Cagiannos, I. et al.: A validation of two preoperative nomograms predicting recurrence following radical prostatectomy in a cohort of European men. *Urol Oncol*, **7**: 141, 2002
176. Partin AW and Kattan MW. Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. *JAMA* 277, 1445-1451. 1997.

R

177. Haussler, O., Epstein, J. I., Amin, M. B. et al.: Cell proliferation, apoptosis, oncogene, and tumor suppressor gene status in adenosis with comparison to benign prostatic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia, and cancer. *Hum Pathol*, **30**: 1077, 1999
178. Isaacs, W. and Kainu, T.: Oncogenes and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Epidemiol Rev*, **23**: 36, 2001
179. Pegoraro, L., Palumbo, A., Erikson, J. et al.: A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**: 7166, 1984
180. Colombel, M., Symmans, F., Gil, S. et al.: Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am J Pathol*, **143**: 390, 1993
181. Scherr, D. S., Vaughan, E. D., Jr., Wei, J. et al.: BCL-2 and p53 expression in clinically localized prostate cancer predicts response to external beam radiotherapy. *J Urol*, **162**: 12, 1999
182. Moul, J. W., Friedrichs, P. A., Lance, R. S. et al.: Infrequent RAS oncogene mutations in human prostate cancer. *Prostate*, **20**: 327, 1992
183. Rinker-Schaeffer, C. W., Partin, A. W., Isaacs, W. B. et al.: Molecular and cellular changes associated with the acquisition of metastatic ability by prostatic cancer cells. *Prostate*, **25**: 249, 1994
184. Aaronson, S. A.: Growth factors and cancer. *Science*, **254**: 1146, 1991

185. Moreno Sierra J, Bocardo Fajardo G, and López García E. Biología molecular y factores de crecimiento en los procesos proliferativos prostáticos. Tratado de Urología Oncológica , 689-707. 2003. ED.
186. Bussemakers, M. J., van de Ven, W. J., Debruyne, F. M. et al.: Identification of high mobility group protein I(Y) as potential progression marker for prostate cancer by differential hybridization analysis. *Cancer Res*, **51**: 606, 1991
187. Cooke, D. B., Quarmby, V. E., Petrusz, P. et al.: Expression of ras proto-oncogenes in the Dunning R3327 rat prostatic adenocarcinoma system. *Prostate*, **13**: 273, 1988
188. Wong, A. J., Ruppert, J. M., Eggleston, J. et al.: Gene amplification of c-myc and N-myc in small cell carcinoma of the lung. *Science*, **233**: 461, 1986
189. Yang, G, Timme, TL, Frolov, A, Wheeler, TM, and Thompson, TC. Combined c-Myc and caveolin-1-expression in human prostate carcinoma predicts prostate carcinoma progression. *Cancer* 103 (6), 1186-1194. 2005.
190. Weinberg, R. A.: Tumor suppressor genes. *Science*, **254**: 1138, 1991
191. Skuse, G. R. and Ludlow, J. W.: Tumour suppressor genes in disease and therapy. *Lancet*, **345**: 902, 1995
192. Sandberg, A. A.: Cytogenetic and molecular genetic aspects of human prostate cancer: primary and metastatic. *Adv Exp Med Biol*, **324**: 45, 1992
193. Chang, H., Blondal, J. A., Benchimol, S. et al.: p53 mutations, c-myc and bcl-2 rearrangements in human non-Hodgkin's lymphoma cell lines. *Leuk Lymphoma*, **19**: 165, 1995
194. Grizzle, W. E., Myers, R. B., Arnold, M. M. et al.: Evaluation of biomarkers in breast and prostate cancer. *J Cell Biochem Suppl*, **19**: 259, 1994
195. Fan, K., Dao, D. D., Schutz, M. et al.: Loss of heterozygosity and overexpression of p53 gene in human primary prostatic adenocarcinoma. *Diagn Mol Pathol*, **3**: 265, 1994
196. Kubota, Y., Shuin, T., Uemura, H. et al.: Tumor suppressor gene p53 mutations in human prostate cancer. *Prostate*, **27**: 18, 1995
197. Bookstein, R., MacGrogan, D., Hilsenbeck, S. G. et al.: p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. *Cancer Res*, **53**: 3369, 1993
198. Effert, P. J., Neubauer, A., Walther, P. J. et al.: Alterations of the P53 gene are associated with the progression of a human prostate carcinoma. *J Urol*, **147**: 789, 1992

199. Koivisto, P. A. and Rantala, I.: Amplification of the androgen receptor gene is associated with P53 mutation in hormone-refractory recurrent prostate cancer. *J Pathol*, **187**: 237, 1999
200. Brooks, J. D., Bova, G. S., and Isaacs, W. B.: Allelic loss of the retinoblastoma gene in primary human prostatic adenocarcinomas. *Prostate*, **26**: 35, 1995
201. Netto, G. J. and Humphrey, P. A.: Molecular biologic aspects of human prostatic carcinoma. *Am J Clin Pathol*, **102**: S57, 1994
202. Sarkar, F. H., Sakr, W., Li, Y. W. et al.: Analysis of retinoblastoma (RB) gene deletion in human prostatic carcinomas. *Prostate*, **21**: 145, 1992
203. Serrano, M., Hannon, G. J., and Beach, D.: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, **366**: 704, 1993
204. Henshall, S. M., Quinn, D. I., Lee, C. S. et al.: Overexpression of the cell cycle inhibitor p16INK4A in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia predicts early relapse in prostate cancer patients. *Clin Cancer Res*, **7**: 544, 2001
205. Shaffer DR, Viale A, Ishiwata R, and Leversha M. Evidence for a p27 tumor suppressive function independent of its role regulating cell proliferation in the prostate. 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 210-215. 4-1-2005.
206. Brothman, A. R., Peehl, D. M., Patel, A. M. et al.: Frequency and pattern of karyotypic abnormalities in human prostate cancer. *Cancer Res*, **50**: 3795, 1990
207. Gibas, Z., Pontes, J. E., and Sandberg, A. A.: Chromosome rearrangements in a metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet*, **16**: 301, 1985
208. Babu, V. R., Miles, B. J., Cerny, J. C. et al.: Cytogenetic study of four cancers of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet*, **48**: 83, 1990
209. Atkin, N. B. and Baker, M. C.: Chromosome 10 deletion in carcinoma of the prostate. *N Engl J Med*, **312**: 315, 1985
210. Liotta, L. A., Thorgeirsson, U. P., and Garbisa, S.: Role of collagenases in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, **1**: 277, 1982
211. Holly, S. P., Larson, M. K., and Parise, L. V.: Multiple roles of integrins in cell motility. *Exp Cell Res*, **261**: 69, 2000
212. Condeelis, J. S., Wyckoff, J. B., Bailly, M. et al.: Lamellipodia in invasion. *Semin Cancer Biol*, **11**: 119, 2001

213. Okegawa, T., Li, Y., Pong, R. C. et al.: Cell adhesion proteins as tumor suppressors. *J Urol*, **167**: 1836, 2002
214. Kiefer, J. A. and Farach-Carson, M. C.: Type I collagen-mediated proliferation of PC3 prostate carcinoma cell line: implications for enhanced growth in the bone microenvironment. *Matrix Biol*, **20**: 429, 2001
215. Stamenkovic, I.: Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*, **200**: 448, 2003
216. Stamenkovic, I.: Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*, **200**: 448, 2003
217. Waltregny, D., Bellahcene, A., Van, R., I et al.: Prognostic value of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, **90**: 1000, 1998
218. Bussemakers, M. J., van Bokhoven, A., Tomita, K. et al.: Complex cadherin expression in human prostate cancer cells. *Int J Cancer*, **85**: 446, 2000
219. Nagle, R. B., Hao, J., Knox, J. D. et al.: Expression of hemidesmosomal and extracellular matrix proteins by normal and malignant human prostate tissue. *Am J Pathol*, **146**: 1498, 1995
220. Takeichi, M.: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, **251**: 1451, 1991
221. Wijnhoven, B. P., Dinjens, W. N., and Pignatelli, M.: E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg*, **87**: 992, 2000
222. Behrens, J.: Cadherins as determinants of tissue morphology and suppressors of invasion. *Acta Anat (Basel)*, **149**: 165, 1994
223. Vleminckx, K., Vakaet, L., Jr., Mareel, M. et al.: Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*, **66**: 107, 1991
224. Takeichi, M.: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, **251**: 1451, 1991
225. Umbas, R., Schalken, J. A., Aalders, T. W. et al.: Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res*, **52**: 5104, 1992
226. Stewart, D. A., Cooper, C. R., and Sikes, R. A.: Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer. *Reprod Biol Endocrinol*, **2**: 2, 2004
227. Ivaska, J. and Heino, J.: Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*, **57**: 16, 2000

228. Schmelz, M., Cress, A. E., Scott, K. M. et al.: Different phenotypes in human prostate cancer: alpha6 or alpha3 integrin in cell-extracellular adhesion sites. *Neoplasia*, **4**: 243, 2002
229. Stewart, D. A., Cooper, C. R., and Sikes, R. A.: Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer. *Reprod Biol Endocrinol*, **2**: 2, 2004
230. Varner, J. A. and Cheresch, D. A.: Tumor angiogenesis and the role of vascular cell integrin alphavbeta3. *Important Adv Oncol*, 69, 1996
231. Koblinski, J. E., Ahram, M., and Sloane, B. F.: Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta*, **291**: 113, 2000
232. Stamenkovic, I.: Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*, **200**: 448, 2003
233. Lichtinghagen, R., Musholt, P. B., Lein, M. et al.: Different mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue. *Eur Urol*, **42**: 398, 2002
234. Nagakawa, O., Murakami, K., Yamaura, T. et al.: Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) on prostate cancer cell lines. *Cancer Lett*, **155**: 173, 2000
235. Stewart, D. A., Cooper, C. R., and Sikes, R. A.: Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer. *Reprod Biol Endocrinol*, **2**: 2, 2004
236. Usmani, B. A., Harden, B., Maitland, N. J. et al.: Differential expression of neutral endopeptidase-24.11 (neprilysin) and endothelin-converting enzyme in human prostate cancer cell lines. *Clin Sci (Lond)*, **103 Suppl 48**: 314S, 2002
237. Stewart, D. A., Cooper, C. R., and Sikes, R. A.: Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer. *Reprod Biol Endocrinol*, **2**: 2, 2004
238. Festuccia, C., Dolo, V., Guerra, F. et al.: Plasminogen activator system modulates invasive capacity and proliferation in prostatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis*, **16**: 513, 1998
239. Stewart, D. A., Cooper, C. R., and Sikes, R. A.: Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer. *Reprod Biol Endocrinol*, **2**: 2, 2004
240. Cohen, R. L., Xi, X. P., Crowley, C. W. et al.: Effects of urokinase receptor occupancy on plasmin generation and proteolysis of basement membrane by human tumor cells. *Blood*, **78**: 479, 1991

241. Koblinski, J. E., Ahram, M., and Sloane, B. F.: Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta*, **291**: 113, 2000
242. Kayser, K., Richter, N., Hufnagl, P. et al.: Expression, proliferation activity and clinical significance of cathepsin B and cathepsin L in operated lung cancer. *Anticancer Res*, **23**: 2767, 2003
243. Hughes, SJ, Glover, TW, Zhu, XX, Kuick, R, Thoraval D, and Oringer, Mb. A novel amplicon at 8p22-23 results in overexpression of cathepsin B in esophageal adenocarcinoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 12410-12415. 1998.
244. Lah, T. T. and Kos, J.: Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. *Biol Chem*, **379**: 125, 1998
245. Lah, T. T., Strojnik, T., Levicar, N. et al.: Clinical and experimental studies of cysteine cathepsins and their inhibitors in human brain tumors. *Int J Biol Markers*, **15**: 90, 2000
246. Campo, E., Munoz, J., Miquel, R. et al.: Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. *Am J Pathol*, **145**: 301, 1994
247. Lah, T. T., Kokalj-Kunovar, M., Kastelic, L. et al.: Cystatins and stefins in ascites fluid from ovarian carcinoma. *Cancer Lett*, **61**: 243, 1992
248. Lah, T. T., Calaf, G., Kalman, E. et al.: Cathepsins D, B, and L in transformed human breast epithelial cells. *Breast Cancer Res Treat*, **39**: 221, 1996
249. Lah, T. T., Calaf, G., Kalman, E. et al.: Cathepsins D, B and L in breast carcinoma and in transformed human breast epithelial cells (HBEC). *Biol Chem Hoppe Seyler*, **376**: 357, 1995
250. Lah, T. T., Kokalj-Kunovar, M., Drobnic-Kosorok, M. et al.: Cystatins and cathepsins in breast carcinoma. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **373**: 595, 1992
251. Lah, T. T., Kalman, E., Najjar, D. et al.: Cells producing cathepsins D, B, and L in human breast carcinoma and their association with prognosis. *Hum Pathol*, **31**: 149, 2000
252. Budihna, M, Strojan, P, Smid, L, Skrk, J, Vrhovec, I, and Zuupevc, A. Prognostic value of cathepsins B, H, L and D and their endogenous inhibitors stefins A and B in head and neck carcinoma. *Biol Chem* , 385-390. 1996.
253. Visscher, D. W., Sloane, B. F., Sameni, M. et al.: Clinicopathologic significance of cathepsin B immunostaining in transitional neoplasia. *Mod Pathol*, **7**: 76, 1994

254. Friedrich, B., Jung, K., Lein, M. et al.: Cathepsins B, H, L and cysteine protease inhibitors in malignant prostate cell lines, primary cultured prostatic cells and prostatic tissue. *Eur J Cancer*, **35**: 138, 1999
255. Sinha, A. A., Quast, B. J., Wilson, M. J. et al.: Prediction of pelvic lymph node metastasis by the ratio of cathepsin B to stefin A in patients with prostate carcinoma. *Cancer*, **94**: 3141, 2002
256. Barret, A. J. Human Cathepsin B1. *Biochem J* 131, 809-822. 21973.
257. Wang X, Chan SJ, and Eddy RL. *Chromosome assignment of cathepsin B (CTSB) to 8p22 and cathepsin H (CTSH) to 15q24-q25. 1987; (Comunicació). Cytogenet Cell Genet* 46, 710-711. 1987.
258. Riese, R. J. and Chapman, H. A.: Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol*, **12**: 107, 2000
259. Sinha, A. A., Gleason, D. F., Staley, N. A. et al.: Cathepsin B in angiogenesis of human prostate: an immunohistochemical and immunoelectron microscopic analysis. *Anat Rec*, **241**: 353, 1995
260. Stamenkovic, I.: Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*, **200**: 448, 2003
261. Koblinski, J. E., Ahram, M., and Sloane, B. F.: Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta*, **291**: 113, 2000
262. Cathepsin B and L And their inhibitors stefin B and cystatin C as markers for malignant progression of benign meningiomas. Trinkaus M, Vranic A, Dolenc VV, and Lah TT. *Int.J.Biol.Markers* 1[20], 50-59. 2005.
263. Fernandez, P. L., Farre, X., Nadal, A. et al.: Expression of cathepsins B and S in the progression of prostate carcinoma. *Int J Cancer*, **95**: 51, 2001
264. Sinha, A. A., Wilson, M. J., Gleason, D. F. et al.: Immunohistochemical localization of cathepsin B in neoplastic human prostate. *Prostate*, **26**: 171, 1995
265. Sinha, A. A., Quast, B. J., Wilson, M. J. et al.: Ratio of cathepsin B to stefin A identifies heterogeneity within Gleason histologic scores for human prostate cancer. *Prostate*, **48**: 274, 2001
266. Sinha, A. A., Quast, B. J., Wilson, M. J. et al.: Prediction of pelvic lymph node metastasis by the ratio of cathepsin B to stefin A in patients with prostate carcinoma. *Cancer*, **94**: 3141, 2002
267. Miyake H, Hara I, and Eto H. Serum level of cathepsin B and its density in men with prostate cancer as novel markers of disease progression. *Anticancer Res.* 24 (4), 2573-2577. 2004.

268. Bohley P, Kirschke H, Schaper S, and Wiederanders B. Principle of the regulation of intracellular proteolysis. *Symposia Biologica Hungarica* 25, 101-118. 1984.
269. Collette J, Boccock JP, Ahn K, Chapman RL, Godbold G, Yeyeodu S, and Erickson AH. Biosynthesis and alternate targeting of the lysosomal cystein protease cathepsin L. *Int Rev Cytol* 241, 1-51. 2004.
270. Dendhardt DT, Greenberg AH, Egan SE, Hamilton RT, and Wright JA. Cystein proteinase cathepsin L expression correlates closely with the metastatic potential of H-ras transformed murine fibroblasts. *Oncogene* 2, 55-59. 1987.
271. Mason R W, Johnson DA, Barret AJ, and Chapman HA. Elastinolytic activity of human cathepsin L. *Biochem J* 233, 925-927. 1986.
272. Kirschke H, Kembhavi AA, Bohley P, and Barret J. Action of rat liver cathepsin L on collagen and other substrates. *Biochem J* 201, 367-372. 1982.
273. Kominami, E., Li K, and Katunuma N. Activation of intramyofibril autophagic lysosomal system in muscular dystrophy. *Am J Pathol* 127, 461-466. 1987.
274. Tsuchida K, Aihara H, Isogai K, Hanada K, and Shibata N. Degradation of myocardial structural proteins in myocardial infarcted dogs is reduced by Ep459, a cysteineproteinase inhibitor. *Biol Chem* 367, 39-45. 1986.
275. Olbricht CJ, Cannon JK, Garg LC, and Tisher CC. Activities of cathepsins B and L in isolated nephron segments from proteinuric and nonproteinuric rats. *Am J Physiol* 250, 1044-1062. 1986.
276. Castiglioni, T., Merino, M. J., Elsner, B. et al.: Immunohistochemical analysis of cathepsins D, B, and L in human breast cancer. *Hum Pathol*, **25**: 857, 1994
277. Colella, R. and Casey, S. F.: Decreased activity of cathepsins L + B and decreased invasive ability of PC3 prostate cancer cells. *Biotech Histochem*, **78**: 101, 2003
278. Torres-Rosado A, O'Shea KS, Tsuji A, Chou AH, and Hurachi K. Hepsin, a putative cell-surface serine protease, is required for mammalian cell growth. *Biochemistry* 90, 7181-7185. 2005.

279. Zacharsky LR, Ornstein DL, Memoli VA, Rousseau SM, and Kisiel W. Expression of the factor VII activating protease, hepsin, in situ in renal cell carcinoma. *Thromb.Haemostasis* 79, 876-877. 1998.
280. Tanimoto H, Yan Y, Clarke J, Korourian S, Shigemasa K, and Parmley T. Hepsin, a cell surface serin protease identified in hepatoma cells, is overexpressed in ovarian cancer. *Cancer Res.* 57, 2884-2887. 1997.
281. Chen, Z., Fan, Z., McNeal, J. E. et al.: Hepsin and maspin are inversely expressed in laser capture microdissected prostate cancer. *J Urol*, **169**: 1316, 2003
282. Magee, J. A., Araki, T., Patil, S. et al.: Expression profiling reveals hepsin overexpression in prostate cancer. *Cancer Res*, **61**: 5692, 2001
283. Luo J, Duggan DJ, Chen Y, Sauvageot, J., Ewing CM, and Bittner ML. Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: Molecular dissection by gene expression profiling. *Cancer Res.* 61, 4683-4688. 2001.
284. Ernst T, Hergenbahn M, Kenzelmann M, Cohen CD, Bonrouchi M, and Weninger A. Decrease and gain of gene expression are equally discriminatory markers for prostatic carcinoma: A gene expression analysis on total and microdissected prostate tissue. *Am J Pathol* 160, 2169-2180. 2002.
285. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh S, Shah R, Varambally S, and Kurachi K. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412, 822-826. 2001.
286. Fernandez PL and Thomson T. Alterations of genes and their expression in prostate carcinoma. *Handbook of immunohistochemistry and in situ hybridation of human carcinomas* 2, 307-311. 2004.
287. Klezovitch O, Chevillet J, Mirosevich J, Roberts RL, Matusik RJ, and Vasioukhin V. Hepsin promotes prostate cancer progression and metastases. *Cancer cell* 6, 185-195. 2004.
288. Srikantan V, Valladares M, Rhim JS, Moul JW, and Srivastava s. Hepsin inhibits cell growth/invasion in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 62(23), 6812-6816. 2002.

289. McGowen, R., Biliran, H., Jr., Sager, R. et al.: The surface of prostate carcinoma DU145 cells mediates the inhibition of urokinase-type plasminogen activator by maspin. *Cancer Res*, **60**: 4771, 2000
290. Marioni G, Blandamura S, Giacomelli L, Calgaro N, Segato P, Leo G, Fischetto D, and Staffieri A de Filippis C. Nuclear expression of maspin is associated with a lower recurrence rate and a longer disease-free survival after surgery for squamous cell carcinoma of the larynx. *Hystopathology* 46[5], 576-582. 2005.
291. Scheneider SS, Schick C, Fish KE, Miller E, Pena JC, and Treter SD. A serin proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 3147. 1995.
292. Chen, Z., Fan, Z., McNeal, J. E. et al.: Hepsin and maspin are inversely expressed in laser capture microdissected prostate cancer. *J Urol*, **169**: 1316, 2003
293. Cher, M. L., Biliran, H. R., Jr., Bhagat, S. et al.: Maspin expression inhibits osteolysis, tumor growth, and angiogenesis in a model of prostate cancer bone metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 7847, 2003
294. Abraham S, Zhang W, Greenberg N, and Zhang M. Maspin functions as a tumor suppressor by increasing cell adhesion to extracellular matrix in prostate tumor cells. *J Urol* 169, 1157-1161. 2003.
295. Bass R, Moreno AM, and Ellis V. Maspin inhibits cell migration in the absence of protease inhibitory activity. *J.Biol.Chem.* 277[49], 46845-46848. 2002.
296. Huggings C, Stephens RC, and Hodges CV. Studies on prostatic cancer: the effects of castration on advance carcinoma of the prostate gland. *Arch.Surg.* 43, 209. 1941.
297. Maggiolini, M., Vivacqua, A., Carpino, A. et al.: The mutant androgen receptor T877A mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of genistein and quercetin on human LNCaP prostate cancer cells. *Mol Pharmacol*, **62**: 1027, 2002
298. Cude KJ, Dixon SC, Guo Y, Lisella J, and Figg, W. The androgen receptor: genetic considerations in the development and treatment of prostate cancer. *Journal of Molecular Medicine* 77, 419-426. 1999.
299. Cabral DF, Santos A, Ribeiro ML, Mesquita JC, Carvalho-Salles AB, and Kackel C. Rarity of DNA sequence alterations in the promoter region of

- the human androgen receptor gene. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 12[37], 1789-1794. 2004.
300. Sanchez Zalabardo D and Rosell Costa D. Human androgen receptor gene mutations in patients with clinically localized prostate cancer. *Actas Urol.Esp.* 3[28], 221-229. 2004.
301. Debes JD and Tindall DJ. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Lett.* 10[187], 1-7. 2002.
302. Culig, Z., Stober, J., Gast, A. et al.: Activation of two mutant androgen receptors from human prostatic carcinoma by adrenal androgens and metabolic derivatives of testosterone. *Cancer Detect Prev*, **20**: 68, 1996
303. Hobisch, A., Culig, Z., Radmayr, C. et al.: Distant metastases from prostatic carcinoma express androgen receptor protein. *Cancer Res*, **55**: 3068, 1995
304. Petrowsky H, Sturm I, and Graubitz DA. Relevance of Ki-67 antigen expression and K-ras mutation in colorectal liver metastases. *Eur.J.Surg.Oncol.* 27, 80-87. 2001.
305. Hideyuki Ishida, Hideaki Miwa, and Masayuki Tatsuta. KI-67 and CEA expression as prognostic markers in Duke's C colorectal cancer. *Cancer Lett.* 207, 109-115. 2004.
306. Bubendorf, L., Tapia, C., Gasser, T. C. et al.: Ki67 labeling index in core needle biopsies independently predicts tumor-specific survival in prostate cancer. *Hum Pathol*, **29**: 949, 1998
307. Ojea Calvo A, Mosteiro Cerviño F, and Dominguez Freire F. Utilidad de la expresión de Ki-67 en las biopsias preoperatorias para predecir la recidiva bioquímica del cáncer de próstata después de la prostatectomía radical. *Actas Urol.Esp.* 9[28], 650-660. 2004.
308. Zudaire Bergera JJ, Sánchez Zalabardo D, and Arocena García-Tapia J. Expresión de p53 y Ki-67 en piezas de prostatectomía radical. Relación con los datos clínico-patológicos y supervivencia. *Actas Urol.Esp.* 24[4], 307-313. 2000.
309. Kononen J, Bubendorf L, and Kallioniemi A. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Med* 4, 844-847. 1998.

310. Fernandez, P. L., Nayach, I., Fernandez, E. et al.: Tissue macroarrays ("microchops") for gene expression analysis. *Virchows Arch*, **438**: 591, 2001
311. Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, and Buerger H. Demystified...tissue microarray technology. *Mol Pathol*. 4[56], 198-204. 2003.
312. Lang Thomas and Secic Michelle. How to report statistics in Medicine. 1997. ACP Series.
313. Jourdan F, Sebbagh N, and Comperat E. Tissue microarray technology: validation in colorectal carcinoma and analysis of p53, hMLH1 and hMSH2 immunohistochemical expression. *Virchows Arch*. 443, 115-121. 2003.
314. Rubin, M., Dunn R, Strawderman M, and Pienta, K. J. Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer. *Am J Surg Pathol* 3[26], 312-319. 2002.
315. Nocito, A., Kononen J, and Kallioniemi A. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int.J.Cancer* 94, 1-5. 2001.
316. Torhorst J, Bucher C, and Kononen J. Tissue microarray for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 159, 2249-2256. 2001.
317. Shibata M, Kanamori S, and Isahara K. *Participation of cathepsins B and D in apoptosis of pc12 cells following serum deprivation.* *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 251, 199-203. 1998.
318. Poole, A. R., Tiltman, K. J., Recklies, A. D. et al.: Differences in secretion of the proteinase cathepsin B at the edges of human breast carcinomas and fibroadenomas. *Nature*, **273**: 545, 1978
319. De Wever, O. and Mareel, M.: Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol*, **200**: 429, 2003
320. McAlhany SJ, Ressler SJ, Larsen M, Tuxhorn JA, and Yang F. Promotion of angiogenesis by ps20 in the differential reactive stroma prostate cancer xenograft model. *Cancer Res*. 63[18], 5859-5865. 2003.
321. Condon MS. The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. *Semin.Cancer Biol*. 15[2], 132-137. 2005.

322. Shariat, S. F., Shalev, M., Menesses-Diaz, A. et al.: Preoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) (TGF-beta(1)) strongly predict progression in patients undergoing radical prostatectomy. *J Clin Oncol*, **19**: 2856, 2001
323. West AF, O'Donnell M, Carlton RG, Neal DE, and Leung HY. Correlation of vascular endothelial growth factor expression with fibroblast growth factor-8 expression and clinico-pathologic parameters in human prostate cancer. *Br.J.Cancer* 85[4], 576-583. 2001.
324. Sinha, A. A., Quast, B. J., Wilson, M. J. et al.: Ratio of cathepsin B to stefin A identifies heterogeneity within Gleason histologic scores for human prostate cancer. *Prostate*, **48**: 274, 2001
325. Christensson A, Laurell CB, and Lilja H. Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reaction with extracellular serin proteinase inhibitors. *Eur.J.Biochem.* 194, 755-763. 1990.
326. Hideaki Miyake, Isao H, and Hiroshi Eto. Serum level of Cathepsin B and its density in men with prostate cancer as novel markers of disease progression. *Anticancer Res.* 24, 2573-2578. 2004.
327. Chauhan S, Goldstein L, and Gottesman M. Expression of Cathepsin L in Human Tumors. *Cancer Res.* 51, 1478-1481. 1991.
328. Kane S and Gottesman M. The role of cathepsin L in malignant transformation. *Semin.Cancer Biol.* 1, 127-136. 1990.
329. Jean D, Rousselet N, and Frade R. Expression of cathepsin L in human tumor cells is under control of distinct regulatory mechanisms. *Oncogene* , 1-11. 2005.
330. Thomssen C, Schmitt M, Goretzki L, and Oppelt P. Prognostic value of the cystein proteases cathepsins B and cathepsin L in human breast cancer. *Clin.Cancer Res.* 1[7], 741-746. 1995.
331. Troy AM, Sheahan K, Mulcahy HE, and Duffy MJ. Expression of cathepsin B and L antigen and activity is associated with early colorectal cancer progression. *Eur.J.Cancer* 40, 1610-1616. 2004.
332. Strojnik T, Rajko K, and Trinkaus M. Cathepsin L in glioma progression: Comparison with cathepsin B. *Cancer Detect.Prev.* 29, 448-455. 2005.

333. Magee, J. A., Araki, T., Patil, S., Ehrig, T., and True, L. Expression profiling reveals hepsin overexpression in prostate cancer. 2005.
334. Stephan, C., Yousef, G. M., and Scorilas, A. Hepsin is highly over expressed in and a new candidate for a prognostic indicator in prostate cancer. *Journal of Urology* 171, 187-191. 2004.
335. Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, and Yoshida H. Expression of maspin predicts poor prognosis in breast-cancer patients. *Anticancer Res.* 4[100], 452-455. 2002.
336. Umekita Y and Yoshida H. Expression of maspin is up-regulated during the progression of mammary ductal carcinoma. *Histopathology* 6[42], 5451-545. 2003.
337. Pierson CR, McGowen R, Grignon D, Sakr W, Dey, J., and Sheng, S. Maspin is up-regulated in premalignant prostate epithelia. *The prostate* 53, 255-262. 2002.
338. Zou Z, Zhang W, Young D, Gleave MG, Rennie P, Connel T, Connelly, R. R., Moul JW, Srivastava s, and Sesterhenn, I. A. Maspin expression profile in human prostate cancer (CaP) and in vitro. Induction of maspin expression by androgen ablation. *Clin.Cancer Res.* 8, 1172-1177. 2002.
339. Marcelli, M. and Cunningham, G. R. Hormonal signaling in prostatic hyperplasia and neoplasia. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 84, 3463-3468. 1999.
340. Culig, Z. and Hobisch, A. Androgen receptor: an update of mechanism of action in prostate cancer. 2005.
341. Zegarra-Moro O, Schmidt LJ, Huang H, and Tindall DJ. Disruption of Androgen Receptor Function Inhibits Proliferation of Androgen-refractory Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* 62[15], 1008-1013. 2002.
342. Henshall, S. M., Quinn, D. I., Lee, C. S. et al.: Altered expression of androgen receptor in the malignant epithelium and adjacent stroma is associated with early relapse in prostate cancer. *Cancer Res*, **61**: 423, 2001
343. Grossfeld, G., Hayward, S. W., Tlsty W, and Cunha GR. The role of the stroma in prostatic carcinogenesis. *Endocr.Relat Cancer* 5, 253-270. 1998.

344. Daliani, D. and Papandreou, C. N.: Markers of androgen-independent progression of prostatic carcinoma. *Semin Oncol*, **26**: 399, 1999
345. Igawa, T., Lin, F. F., Lee, M. S. et al.: Establishment and characterization of androgen-independent human prostate cancer LNCaP cell model. *Prostate*, **50**: 222, 2002
346. Ruizeveld de Winter, J. A., Janssen, P. J., Sleddens, H. M. et al.: Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer. *Am J Pathol*, **144**: 735, 1994
347. Newmark JR, Ardi D, and Tonb DC. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 6319-6323. 1992.
348. Crawford, D., Eisenberger, M., McLeod, D. G., Spaulding J, and Benson B. A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma. *N.Engl.J.Med.* 17, 419-424. 1989.
349. Crawford, E. D.: Early versus late hormonal therapy: debating the issues. *Urology*, **61**: 8, 2003
350. Suwa, Y., Takano, Y., Iki, M. et al.: Prognostic significance of Ki-67 expression in transitional cell bladder carcinoma after radical cystectomy. *Pathol Res Pract*, **193**: 551, 1997
351. Bettencourt, M. C., Bauer, J. J., Sesterhenn, I. A. et al.: Ki-67 expression is a prognostic marker of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Urol*, **156**: 1064, 1996
352. Rudolph P, Lappe T, Kreipe H, Parwaresch MR, and Schmidt D. Determination of proliferation activity of prostate cancers by means of nuclear proliferation-associated formalin resistant Ki-S5 antigens. *Verh Dtsch Ges Pathol* 77, 98-102. 1993.
353. Limas C and Frizelle SP. Proliferative activity in benign and neoplastic prostatic epithelium. *J.Pathol.* 3[174], 201-208. 1994.
354. Helpap, B. Cell kinetics studies on prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and atypical adenomatous hyperplasia (AAH) of the prostate. *Pathol REs Pract* 9[191], 904-907. 1995.
355. Bryden AA, Freemont AJ, Clarke NW, and George NJ. Ki-67 index in metastatic prostate cancer. *Eur Urol.* 6[40], 673-676. 2001.

356. Cheng, L., Pisansky, T. M., Sebo, T. J. et al.: Cell proliferation in prostate cancer patients with lymph node metastasis: a marker for progression. *Clin Cancer Res*, **5**: 2820, 1999
357. Revelos K, Petraky C, Grokorakis A, Scorilas A, and Papanastasou P. p27 and Ki-67 Immunohistochemical Expression in Radical Prostatectomy Specimens of Patients with Clinically Localized Prostate Cancer. *In Vivo* 19, 911-920. 2005.
358. Inoue T, Segawa T, Shiraishi T, Yoshida T, Toda Y, Yamada T, Kinukawa N, Kinoshita H, Kamoto, T., and Ogawa O. Androgen receptor, Ki-67, and p53 expression in radical prostatectomy specimens predict treatment failure in Japanese population. *Urology* 2[66], 332-337. 2005.