



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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



Universitat Autònoma de Barcelona



Parc Taulí Sabadell
Hospital Universitari

Departamento de Cirugía

Programa de Doctorado: Cirugía y Ciencias Morfológicas

**Determinación del estrés oxidativo en plasma seminal como
parámetro diagnóstico en pacientes con cáncer de próstata**

Tesis Doctoral presentada por

Miriam Barrio Muñoz

Tesis realizada bajo la dirección del

Prof. Salvador Navarro Soto y del Prof. Joan Prats López

Miriam Barrio Muñoz
Doctoranda

Prof. Salvador Navarro Soto
Director / Tutor

Prof. Joan Prats López
Director

Mayo 2017



SALVADOR NAVARRO SOTO, Profesor Agregado de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe de Servicio de Cirugía General y Digestiva de Parc Taulí Sabadell, Hospital Universitari.

Y

JOAN PRATS LÓPEZ, Profesor Asociado de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe de Servicio de Urología de Parc Taulí Sabadell, Hospital Universitari.

CERTIFICAN

Que la tesis doctoral titulada "Determinación del estrés oxidativo en plasma seminal como parámetro diagnóstico en pacientes con cáncer de próstata" ha sido realizada por Miriam Barrio Muñoz bajo su dirección y es apta para su defensa pública delante de un tribunal para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Prof. Salvador Navarro Soto

Prof. Joan Prats López

Barcelona, 2 de mayo de 2017

A mi padre

Sé tú el cambio que quieres para el mundo

Agradecimientos

La realización de esta Tesis doctoral ha sido posible gracias al apoyo y trabajo de un gran número de personas a las que me gustaría expresar mi agradecimiento.

A mis directores de Tesis. Al Dr. Salva Navarro; por su apoyo, sugerencias y tiempo dedicado a este proyecto. Al Dr. Joan Prats; director, tutor y al que considero como a un padre por su acogida, sus consejos, su profesionalidad y su entusiasmo contagioso.

Al Dr. Agustín García Peiró y a la Dra. M^a José Amengual; sin ellos este trabajo no habría sido posible.

Al Dr. Carlos Abad; uno de los promotores de esta Tesis y gran compañero y amigo.

A la Dra. M^a Ángeles Cabezuelo y a la Dra. Irmgard Costa; por su colaboración en la comprensión de los análisis histológicos y su aportación iconográfica.

Al Dr. Toni Malet y a la Dra. Eva Ballesteros; por su participación en los procedimientos de diagnóstico por la imagen y obtención de muestras para este trabajo.

A Coloma Moreno; por su dedicación para perfeccionar la redacción de este manuscrito y a Joan Carles Oliva; por su colaboración en el tratamiento estadístico de los datos.

A los miembros del Servicio de Urología del Hospital Parc Taulí, por su apoyo incondicional durante la residencia y más allá: Àngel, Naim, Darío, Edu, Jose Luis, Raúl y Jesús; de vosotros he aprendido mucho más que Urología.

A mis queridos "resis": Josep, Younes, Marta y Leti; siempre seremos los cinco primeros.

A Jose Ignacio Idoipe; sus consejos ayudaron a mis maestros tanto como a mí.

A mis padres; sois un ejemplo de superación personal, de valentía y de calidad humana, me siento afortunada y orgullosa de ser vuestra hija.

A mis amigos y seres queridos; por su apoyo y comprensión en todo momento.

A todos los pacientes; verdaderos protagonistas y destinatarios de las investigaciones médicas.

Índice

INTRODUCCIÓN	2
1. CÁNCER DE PRÓSTATA (CP)	2
1.1. Epidemiología	2
1.1.1 Incidencia	2
1.1.2. Mortalidad y prevalencia	2
1.2 Diagnóstico	3
1.2.1 Tacto rectal.....	3
1.2.2 Antígeno Prostático Específico (<i>Prostate-Specific Antigen</i> o PSA)	4
1.2.2.1 PSA como marcador diagnóstico de CP	4
1.2.2.2 Cribado poblacional y oportunista del CP basado en el PSA	6
1.2.2.3 Aumentando la especificidad del PSA: fracción, velocidad y tiempo de duplicación del PSA.....	8
1.2.3 Biopsia de próstata.....	11
1.2.3.1 Biopsia inicial	11
1.2.3.2 Biopsias de repetición	12
1.2.3.3 Anatomía patológica de la biopsia prostática	13
1.2.3.4 Limitaciones de la biopsia.....	20
1.2.4 Nuevos biomarcadores diagnósticos de CP	22
1.2.4.1 Nuevos biomarcadores en suero.....	23
1.2.4.2 Nuevos biomarcadores en orina	25
1.2.5 Nuevas técnicas de diagnóstico por la imagen	27
1.2.5.1 Definición de la RM multiparamétrica	27
1.2.5.2 Modelo de lectura de la RM multiparamétrica	30
1.2.5.3 Utilidad de la RM multiparamétrica en el diagnóstico de CP	30
1.2.5.4 Limitaciones de la RM multiparamétrica en el diagnóstico de CP	31
1.3 Estadificación y grupos de riesgo de CP	32
2. ESTRÉS OXIDATIVO	35
2.1 Definición bioquímica. Homeostasis REDOX: producción y eliminación de especies reactivas de oxígeno (ERO)	35
2.2 Relación entre estrés oxidativo y CP	37
2.2.1 Mutaciones del ADN nuclear.....	39
2.2.1.1 Alteración de la función proteica	39
2.2.1.2 Inactivación de genes antioxidantes	40
2.2.2 Alteración del metabolismo mitocondrial y cambios relacionados con la edad.....	40
2.2.3 Inflamación crónica y CP	42
3. LÍQUIDO SEMINAL.....	43
3.1 Composición.....	43
3.1.1 Glándulas del aparato reproductor masculino.....	43
3.1.2 Componentes del eyaculado.....	47
3.2 Relación líquido seminal y CP	48
3.3 Relación líquido seminal, CP y estrés oxidativo	50
3.3.1 Fracción corpuscular del líquido seminal y estrés oxidativo	50
3.3.2 Fracción plasmática del líquido seminal, estrés oxidativo y CP	50
3.3.3 Sistemas antioxidantes presentes en el líquido seminal.....	52
3.3.4 Determinación del estrés oxidativo en muestras de líquido seminal	52
3.3.4.1 Métodos directos	53
3.3.4.2 Métodos indirectos	55
JUSTIFICACIÓN.....	62

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	66
1. HIPÓTESIS	66
2. OBJETIVOS	66
2.1 Objetivo principal.....	66
2.2 Objetivos secundarios.....	66
MATERIAL Y MÉTODOS.....	70
1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	70
2. ÁMBITO DEL ESTUDIO.....	70
3. PERIODO DE ESTUDIO.....	71
4. SUBVENCIONES DEL ESTUDIO.....	71
5. POBLACIÓN A ESTUDIO.....	72
5.1 Criterios de inclusión	72
5.2 Criterios de exclusión	72
6. VARIABLES DEL ESTUDIO	73
6.1 Variables principales	73
6.2 Variables secundarias	73
7. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA	73
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
9. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO	75
9.1 Historia asistencial	75
9.2 Toma de muestras de líquido seminal	76
9.3 Cuantificación del estrés oxidativo en plasma seminal	76
9.4 Obtención de biopsias prostáticas.....	77
9.5 Procesamiento y análisis histopatológico de las biopsias prostáticas	78
RESULTADOS.....	85
1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA	85
2. ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA SEMINAL Y DIAGNÓSTICO DE CP. OBJETIVO PRINCIPAL.	90
2.1 Estrés oxidativo en plasma seminal y biopsia prostática	90
2.2 Biopsia prostática y otras variables descriptivas: edad, PSA y volumen prostático	92
3. ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA SEMINAL COMO MARCADOR PRONÓSTICO DE CP.	95
3.1 Estrés oxidativo en plasma seminal y fracción de cilindros afectados	95
3.2 Estrés oxidativo en plasma seminal y grado de Gleason	96
4. ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA SEMINAL Y OTRAS VARIABLES RELEVANTES.	98
4.1 Estrés oxidativo en plasma seminal y edad	98
4.2 Estrés oxidativo en plasma seminal y tacto rectal	100
4.3 Estrés oxidativo en plasma seminal y volumen prostático	101
DISCUSIÓN.....	105
CONCLUSIONES.....	126

BIBLIOGRAFÍA	131
ANEXOS	146
ANEXO I. Límites de referencia para las características del líquido seminal.	146
ANEXO II. Certificado Obtención Beca CIR e Informe del Comité Ético de Investigación Clínica	147
ANEXO III. Hoja Informativa y de Hoja de Consentimiento Informado	150
a) Hoja de información al paciente	150
b) Hoja de Consentimiento Informado para el paciente	153
ANEXO IV. Publicaciones científicas.....	154
Artículo publicado en European Journal of Cancer Prevention.	154

Abreviaturas

8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
ABTS	2,20-azinobis3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP-1	Proteína activadora 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASAP	Atypical small acinar proliferation
ATP	Adenosine triphosphate
AUA	American Urological Association
cols	Colaboradores
EAU	European Association Urology
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ESUR	European Society of Urogenital Radiology
etc	Etcétera
EUA	Estados Unidos de América
FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido (forma reducida)
FDA	Food and Drug Administration
Gy	Gray
GR	Grado de recomendación
GPS	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
HBP	Hipertrofia benigna de próstata
H&E	Hematoxilina y eosina
HIF-1	Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia
HPLC	High-performance liquid chromatography
I ¹²⁵	Iridio 125
IPSS	International prostatic symptom score
ISUP	International Society of Urological Pathology
kDa	Kilodalton
máx.	Máximo

MDA	Malonildialdehído
ml	Mililitros
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NBT	Nitro blue tetrazolium
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Phosphate buffered saline
p. ej.	Por ejemplo
PHI	Prostate health index
PSA	Prostate-specific antigen
PIN	Prostate intraepithelial neoplasia
REDOX	Reacción de reducción-oxidación
RM	Resonancia magnética
RMmp	Resonancia magnética multiparamétrica
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Radioterapia
SCSA	Sperm chromatin structure assay
SELECT	Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial
TC	Tomografía computarizada
TUNEL	Terminal dUTP nick end-labeling

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER DE PRÓSTATA (CP)

1.1. Epidemiología

1.1.1 Incidencia

El cáncer de próstata (CP) constituye un grave problema de salud pública siendo una de las neoplasias más frecuentes en el mundo occidental y la primera causa de atención en la consulta de Urología oncológica. Globalmente, ocupa el primer lugar en frecuencia de cáncer en la población masculina, con tasas de incidencia y mortalidad variables entre los diferentes países siendo, en general, mayores en los países occidentales que en los países en vías de desarrollo¹.

En Estados Unidos (EUA) encontramos incidencias de 80 a 250 por 100.000 habitantes por año, según Estado y grupo étnico, siendo máxima en afro-americanos. En Europa la incidencia es inferior a la hallada en EUA (68 por 100.000 habitantes por año) aunque también existen algunas diferencias entre países, encontrando incidencias de 120 por 100.000 habitantes por año en Finlandia, hasta 40 por 100.000 habitantes por año en Grecia y 45 por 100.000 habitantes por año en España. Los países asiáticos presentan las menores tasas de incidencia, destacando la de China con 2,5 por 100.000 habitantes por año¹.

1.1.2. Mortalidad y prevalencia

A nivel mundial, el CP representa la segunda causa de mortalidad cáncer-específica en el varón de raza blanca, negra, indioamericana e hispana y la cuarta causa de muerte en el varón asiático².

En España fallecen aproximadamente unos 6.000 hombres al año por CP³ y constituye la tercera causa de muerte por cáncer en el sexo masculino, tras el cáncer de pulmón y el colorrectal⁴. Aunque la tasa de mortalidad en nuestro país ha ido aumentando desde los años cincuenta del siglo pasado, la curva se ha suavizado a partir de la década de los años setenta presentando un descenso lento aunque constante desde 1994 (1,8% anual) con una tasa ajustada de 15,04 por 100.000 habitantes por año en 2000^{5,6}.

En cuanto a la prevalencia, se estima que existen en la actualidad 36.500 hombres diagnosticados de CP en España⁵, sin embargo, la prevalencia real de esta patología es difícil de determinar al presentar una elevada frecuencia en hombres de edad avanzada y al tener un periodo de latencia muy largo, con lo cual, muchos casos no llegan a diagnosticarse⁷. El incremento de la esperanza de vida debido a la reducción de la mortalidad global por un mejor control de otras enfermedades de elevada prevalencia como las cardiovasculares, así como, la instauración del cribado poblacional oportunista⁶⁻⁸, entre otros factores, hacen previsible un notable aumento de la incidencia de CP en los próximos años y un mayor incremento de los recursos diagnóstico-terapéuticos implicados en ello⁹.

1.2 Diagnóstico

En la actualidad, las principales herramientas utilizadas para el diagnóstico de sospecha inicial del CP son el tacto rectal y la concentración plasmática total de antígeno prostático específico, aunque el diagnóstico definitivo lo determina la presencia de células neoplásicas en muestras de biopsia de próstata o en la pieza quirúrgica tras exéresis de la glándula.

1.2.1 Tacto rectal

El tacto rectal (TR) es una práctica fundamental de la exploración física urológica, basada en la palpación digital de la próstata a través del recto con el objetivo de detectar zonas de consistencia indurada o pétreas en su superficie.

Existen varios datos de la evidencia científica que avalan el TR como herramienta imprescindible en el proceso diagnóstico e, incluso, pronóstico del CP. En primer lugar, la mayoría de tumores prostáticos se localizan en la zona más externa de la glándula (zona periférica), es decir, son accesibles al TR y si su volumen es mayor o igual a 0,2 ml éstos pueden ser detectados mediante TR¹⁰. En segundo lugar, se sabe que, independientemente del valor de cualquier otro marcador diagnóstico, puede identificarse un CP mediante TR en aproximadamente un 18% de los varones¹⁰. Además, la presencia de un nódulo pétreo o indurado al TR se asocia a mayor riesgo de tumor indiferenciado, es decir, a peor pronóstico, por lo que también debe considerarse necesaria la biopsia de próstata para descartar el diagnóstico¹¹. Por tanto, el TR es un elemento básico de la exploración física urológica pero que posee un gran inconveniente: su baja sensibilidad diagnóstica para CP, especialmente, para tumores ubicados en zonas profundas y anteriores de la próstata¹⁰.

1.2.2 Antígeno Prostático Específico (*Prostate-Specific Antigen* o PSA)

1.2.2.1 PSA como marcador diagnóstico de CP

El antígeno prostático específico (del inglés: *Prostate-Specific Antigen*, en adelante PSA) es una proteína de unos 30 kDa secretada al líquido seminal por las células epiteliales de los acinos prostáticos y al plasma sanguíneo por las células de la membrana basal de dicho epitelio¹².

La concentración plasmática de PSA es, a día de hoy, el principal marcador diagnóstico de CP¹³ de manera que, cuanto mayor es su valor, más probabilidad existe de padecer CP¹⁴⁻¹⁶, tal y como se muestra en la [tabla 1](#).

Tabla 1. La **concentración plasmática de PSA** es una variable cuantitativa continua; cuanto mayor es su valor, mayor es el riesgo de padecer CP [15,16].

Concentración de PSA (ng/ml)	Riesgo de CP (%)
< 4	15
4 - 10	35
> 10	67

Este marcador, sin embargo, presenta limitaciones importantes. En primer lugar, una baja especificidad, ya que, sus niveles pueden estar aumentados en procesos benignos frecuentes como la hiperplasia benigna de próstata (HBP), la inflamación, la infección de orina o de la propia próstata, la manipulación de la vía urinaria, etc.¹². En segundo lugar, a día de hoy no existe un valor de referencia de PSA consensuado como límite superior, ya que, como se muestra en la [tabla 2](#), presentar cifras de PSA por debajo de 4 ng/ml (valor aceptado, de forma general, por la Sociedad Europea de Urología) no exime de riesgo de padecer CP^{14,15}. Thomson y su grupo¹⁵ también ponen de manifiesto dicha limitación determinando la sensibilidad y especificidad del PSA en la detección de CP utilizando varios puntos de corte, observando que al tomar el valor de PSA de 3,1 mg/ml la sensibilidad era del 32% y la especificidad del 87%.

Tabla 2. **Riesgo de CP** en relación a **valores bajos de PSA** (≤ 4 ng/ml). Fuente: Modificado de *European Guideline Urology Prostate Cancer. Update 2016. European Association of Urology (EAU)*.

Concentración de PSA (ng / ml)	Riesgo de CP (%)
0 - 0,5	6,6
0,6 - 1,0	10,1
1,1 - 2,0	17,0
2,1 - 3,0	23,9
3,1 - 4,0	26,9

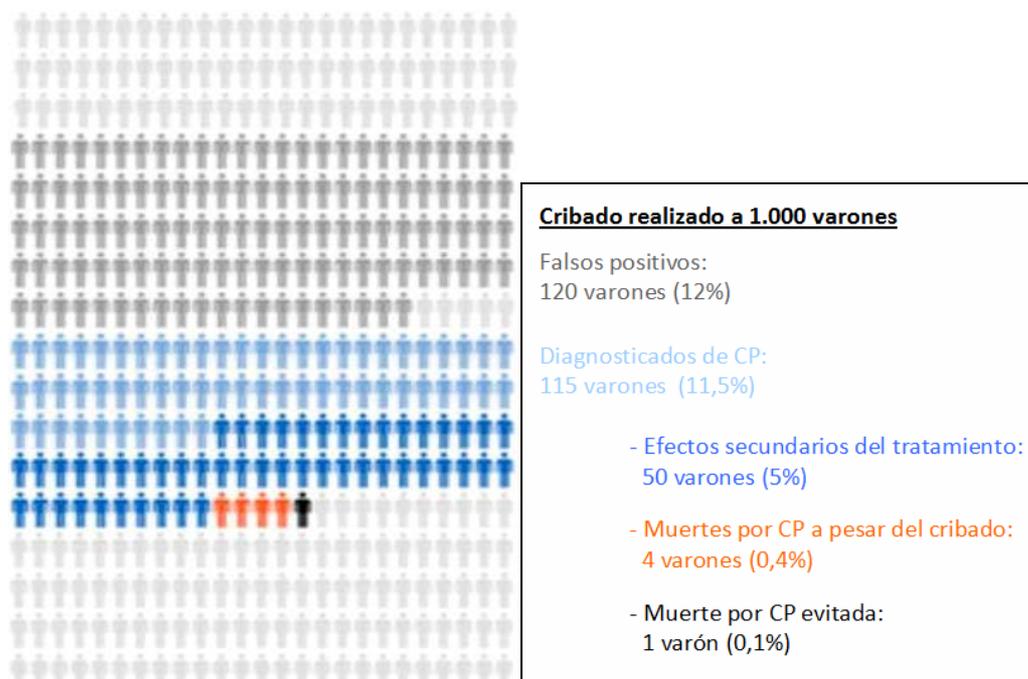
Finalmente otro inconveniente del PSA como marcador diagnóstico es que no permite distinguir la enfermedad indolente de la agresiva, es decir, sus niveles no están directamente relacionados con el grupo de riesgo de recidiva y progresión (ver apartado 1.3 Estadificación y grupos de riesgo del CP). Ello puede conllevar un sobrediagnóstico y un sobretratamiento de los varones con CP indolente¹⁶.

1.2.2.2 Cribado poblacional y oportunista del CP basado en el PSA

Un biomarcador diagnóstico ideal de CP debería permitir identificar con elevada sensibilidad y especificidad a los varones de la población afectados de cáncer y seleccionar a aquéllos que se beneficiarían de dicho procedimiento diagnóstico¹⁷. Además, debería ser una prueba no invasiva y tan económica como fuera posible para fomentar su uso generalizado.

El CP se caracteriza por ser una enfermedad de elevada prevalencia e impacto social, cuya historia natural muestra un periodo de latencia largo y una elevada tasa de curabilidad si el diagnóstico es precoz. Estos rasgos epidemiológicos hacen de ella la candidata ideal para el cribado poblacional, es decir, el estudio sistemático de varones asintomáticos en riesgo de padecer CP. Sin embargo, todavía no existe suficiente evidencia de que la detección poblacional del CP basado en el PSA sea rentable en términos de reducción de mortalidad¹⁸. En general, los grandes ensayos clínicos randomizados no recomiendan el cribado poblacional, ya que, si bien permite el aumento del diagnóstico del CP en estadio temprano o localizado, no lo aumenta en el CP en fase avanzada, ni aporta un beneficio en la supervivencia cáncer específica ni global¹⁹⁻²⁰. Además, se asocia a un sobretratamiento con efectos secundarios, tales como, disfunción eréctil e incontinencia urinaria¹⁷ (figura 1).

Figura 1. **Cribado de CP mediante PSA.** El gráfico indica la proporción de varones que se necesita cribar mediante PSA para lograr un verdadero diagnóstico de CP. Como se observa, la tasa de falsos positivos es mayor que la de verdaderos positivos o diagnosticados de CP. Además, dicho cribado no evitaría cierto número de muertes (0,4%) siendo necesario cribar a 1.000 varones para evitar una muerte por CP. Fuente: modificado de Tonry y cols. 2016 [17].



Por contra, se recomienda una estrategia de cribado oportunista basada en la selección, por parte del profesional médico, de aquellos varones que podrían beneficiarse de un diagnóstico precoz individualizado mediante el PSA y el TR, sin olvidar que ello requiere un diálogo médico-paciente tratando los pros y contras de esta práctica, teniendo en cuenta la comorbilidad y la esperanza de vida de cada varón^{21,22}.

La guía clínica de la Sociedad Europea de Urología, en su última actualización de 2016, recoge los criterios del cribado oportunista aplicables a varones bien informados, con mayor riesgo de padecer CP y con, al menos, 10-15 años de esperanza de vida (tabla 3).

Tabla 3. Recomendaciones para el **cribado y detección precoz del CP**. Fuente: Adaptado de la Guía Europea de Urología, actualización 2016.

Recomendación de la Sociedad Europea de Urología, 2016	Nivel de evidencia	Grado de recomendación
No someter a varones a la prueba del PSA sin asesorarlos sobre los riesgos y beneficios potenciales	3	B
Ofrecer la prueba del PSA a varones bien informados y con esperanza de vida de al menos 10-15 años	3	B
Ofrecer la prueba del PSA a los varones en riesgo de padecer CP: Hombres > 50 años Hombres > 45 años y antecedentes familiares de CP Hombres > 45 años afro-americanos Hombres con PSA >1 ng/ml a los 40 años Hombres con PSA > 2 ng/ml a los 60 años	2b	A

1.2.2.3 Aumentando la especificidad del PSA: fracción, velocidad y tiempo de duplicación del PSA

Con el fin de mejorar la especificidad en la detección precoz del CP existen varias modificaciones del valor del PSA plasmático en base a diferentes características bioquímicas de esta proteína. A continuación, se presentan las modificaciones del valor del PSA y los biomarcadores de mayor uso en la práctica clínica habitual.

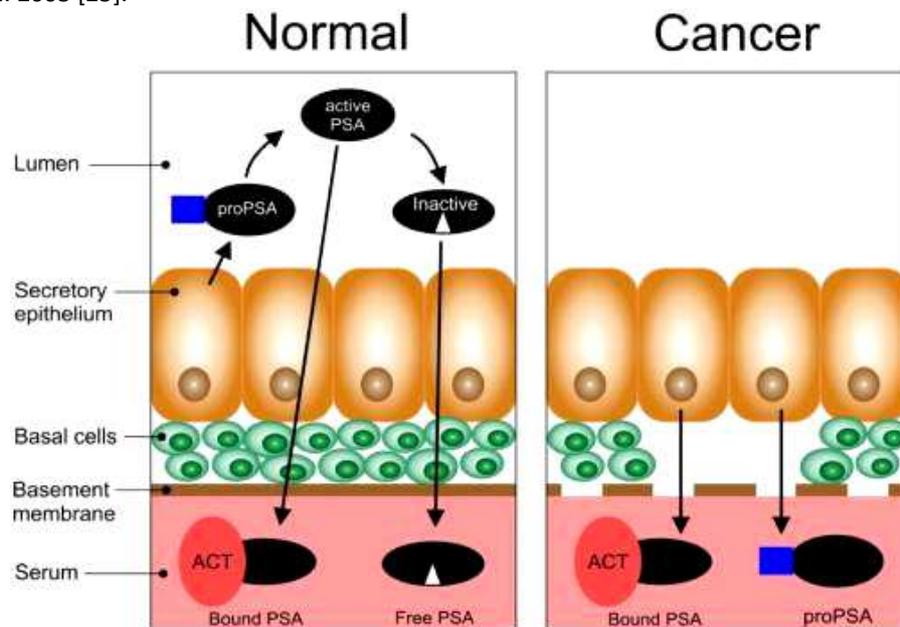
Fracción de PSA libre / total

La fracción de PSA libre / total (PSA l/t) es el parámetro analítico más estudiado y utilizado en la práctica clínica para distinguir entre el proceso benigno prostático más frecuente (HBP) y el CP, ya que, permite estratificar el riesgo de CP en los hombres que presentan valores de PSA total entre 4 y 10 ng/ml y TR no sospechoso de neoplasia, dato que ha sido avalado por dos importantes trabajos^{16,23}.

En la próstata sana, las células epiteliales secretoras que están rodeadas de células basales y membrana basal liberan pro-PSA al lumen acinar que se transforma en PSA activo mediante la calicreína humana²⁴. Parte del PSA activo difunde al plasma sanguíneo donde se une a proteínas, como la alfa 1-antiquimotripsina (ACT) originando

la fracción del PSA unido a proteínas, mientras que el resto es proteolizado para dar lugar a PSA inactivo, que circula en forma de PSA libre. En el CP, se pierde la arquitectura normal de las células y membrana basales, dando lugar a una disminución del procesamiento biológico de pro-PSA a PSA activo y de PSA activo a PSA libre (figura 2). También hay un aumento en los niveles de PSA unido y pro-PSA en el torrente sanguíneo²⁵.

Figura 2. Representación esquemática de la biosíntesis de PSA en el epitelio normal y en el CP. Fuente: Balk y cols. 2003 [25].



ACT = alfa 1-antiquimotripsina.

Por este motivo, la fracción de PSA l/t se considera una herramienta que permite asesorar sobre el riesgo de CP a los hombres cuyo PSA total varía entre 4 y 10 ng/ml.

Velocidad del PSA y tiempo de duplicación del PSA

Ambas determinaciones hacen referencia a dos métodos para expresar la variación del PSA a lo largo del tiempo o cinética del PSA:

- Velocidad del PSA (V-PSA): se define como el aumento anual absoluto del PSA plasmático (ng/ml/año) ²⁶.
- Tiempo de duplicación del PSA (TD-PSA): es el tiempo que transcurre para que el PSA doble su valor ²⁶.

Algunos estudios han observado que la V-PSA que excede en dos determinaciones la cifra umbral de 0,4 ng/ml/año se asocia a una mayor detección de CP de alto riesgo (ver apartado: 1.3 Estadificación y grupos de riesgo del CP) en la biopsia en comparación con la determinación única del PSA total²⁷. Su limitación es la fluctuación fisiológica intrínseca del propio PSA²⁷.

La principal utilidad del TD-PSA es aportar información pronóstica, es decir, orientar al clínico en la valoración del pronóstico de los varones que han recibido un tratamiento de su CP. Una revisión sistemática de Vickers y cols.²⁸ señala que, tras el tratamiento, un TD-PSA < 3 meses sitúa a los pacientes en mayor riesgo de mortalidad por CP, lo que los hace potenciales candidatos para evaluar esquemas alternativos de tratamiento adyuvante. Por contra, un TD-PSA > 10 meses en el contexto de un paciente con recidiva bioquímica tras tratamiento radical sitúa la recidiva local como causa más probable de elevación del PSA, permitiendo al clínico la adopción de las medidas terapéuticas más adecuadas. No obstante, su interpretación no está exenta de limitaciones: presencia de “ruido de fondo” (volumen total de la próstata, proceso de HBP concomitante), las variaciones del intervalo de tiempo entre las mediciones de PSA, etc. Además, estudios prospectivos han observado que estas modificaciones del valor del PSA no aportan información diagnóstica adicional en comparación con la medición exclusiva del PSA sérico²⁹.

1.2.3 Biopsia de próstata

El estudio histológico de la próstata es clave para confirmar el diagnóstico de malignidad ante la sospecha clínico-analítica, y así, poder determinar el pronóstico y el tratamiento del paciente. Sin embargo, la indicación de biopsia de próstata (BP) ha de plantear al clínico el balance entre evitar el infradiagnóstico del CP de alto riesgo, la sobredetección del CP de bajo riesgo (ver apartado 1.3: Estadificación y grupos de riesgo del CP) y la morbi-mortalidad del propio procedimiento³⁰.

1.2.3.1 Biopsia inicial

Las indicaciones consensuadas a nivel internacional para realizar una BP basal o inicial son el TR sospechoso de neoplasia y/o el incremento de las cifras de PSA total por encima de 4 ng/ml. Trabajos previamente citados^{16,23} han permitido mejorar la selección de los varones candidatos a BP con PSA entre 4 y 10 ng/ml mediante el uso de la fracción de PSA l/t. Concretamente, el meta-análisis de Lee y cols.²³ recomienda la realización de BP a aquellos pacientes con PSA total entre 4 y 10 ng sólo si la fracción de PSA l/t es igual o inferior al 20 %, siempre y cuando el TR no sea sospechoso.

En 2016, según el nuevo protocolo de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) para el diagnóstico precoz del CP, se disminuye un punto el umbral de PSA total para la indicación de BP, considerándola necesaria a partir de 3 ng/ml¹⁵.

Si la cifra de PSA se halla elevada en una primera determinación, se recomienda repetir el análisis en el mismo laboratorio y en condiciones estandarizadas, es decir, tras verificar que no ha habido infección ni manipulación urinaria previa³¹.

Las Guías de Cáncer de Próstata de la AEU recomiendan la toma de 10-12 muestras o cilindros de la zona postero-lateral periférica a cada lado de la glándula como patrón óptimo de BP inicial a través de aguja dirigida por ecografía transrectal, previa profilaxis antibiótica^{32,33}.

1.2.3.2 Biopsias de repetición

Las indicaciones de las biopsias de repetición, según la guía clínica de la Sociedad Europea de Urología (2016) son:

- Elevación persistente del PSA total³⁴.
- TR sospechoso (5-30% riesgo de CP)^{30,32}.
- Presencia de proliferación acinar pequeña y atípica (del inglés: *Atypical small acinar proliferation* o ASAP) (40% riesgo de CP)³⁵
- Presencia de neoplasia prostática intraepitelial de alto grado (del inglés: *High grade prostate intraepithelial neoplasia* o HGPIN) extensa (afectación de más de 3 cilindros en la biopsia)³⁶
- Presencia de HGPIN adyacente a glándulas atípicas sospechosas de adenocarcinoma (del inglés, *High-grade PIN with atypical glands* o PINATYP)³⁷.
- Hallazgo histológico de carcinoma intraductal (90% riesgo de CP)³⁸.
- Hallazgos sospechosos de CP en la resonancia magnética multiparamétrica (ver apartado 1.2.5: nuevas técnicas de diagnóstico por la imagen)

1.2.3.3 Anatomía patológica de la biopsia prostática

A continuación se describen los principales parámetros morfológicos que han de constar en el informe anatomo-patológico de la biopsia prostática según la Guía Europea de Cáncer de Próstata y las pautas de la NCCN de 2016. Estos parámetros han sido definidos y validados en la literatura como factores con carácter pronóstico^{39,40}.

Tipo histológico

El tipo histológico más frecuente de CP es el adenocarcinoma, procedente de la célula epitelial, aunque existen otros tipos histológicos que, conjuntamente, representan un 8% del global: carcinoma escamoso, sarcoma y el carcinoma de células transicionales o urotelial. Las Guías Europeas de Urología, basadas en los estudios de Van der Kwast⁴¹, recomiendan ajustar el estudio histopatológico de la BP a unas pautas para emitir un diagnóstico que traduzca una terminología clara y precisa, tal y como se presenta en la [tabla 4](#).

Tabla 4. **Términos diagnósticos** utilizados para describir los hallazgos en una **biopsia de próstata**. Fuente: Van der Kwast y cols. 2013 [41]

Benigno / negativo en cuanto a neoplasia maligna. Si procede, inclúyase una descripción (por ejemplo, atrofia)
Inflamación activa
Inflamación granulomatosa
PIN de alto grado
PIN de alto grado con glándulas atípicas sospechosas de adenocarcinoma (PINATYP)
Foco de glándulas atípicas / lesiones sospechosas de adenocarcinoma o ASAP sospechoso de cáncer
Adenocarcinoma
Carcinoma intraductal

PIN = Prostatic intraepithelial neoplasia. PINATYP = High-grade PIN with atypical glands. ASAP = Atypical small acinar proliferation

La morfología de "proliferación acinar pequeña y atípica" o ASAP se observa en el 3-5% de las biopsias⁴², no siendo en sí una entidad patológica sino una categoría diagnóstica, un hallazgo morfológico en la biopsia que no permite al patólogo establecer con claridad qué tipo de lesión se trata. La importancia de este hallazgo es su valor predictivo en cuanto al riesgo de CP en la segunda biopsia, que oscila entre el 30-40% en un periodo de 5 años según las series⁴², aunque otros estudios señalan un porcentaje inferior⁴³. La guía de la NCCN para el diagnóstico precoz de CP de 2016 recomienda repetir la biopsia a los 3-6 meses tras el hallazgo de ASAP en la biopsia inicial. En caso de no encontrar focos de neoplasia se recomienda un seguimiento estrecho mediante PSA y TR.

Grado histológico de Gleason

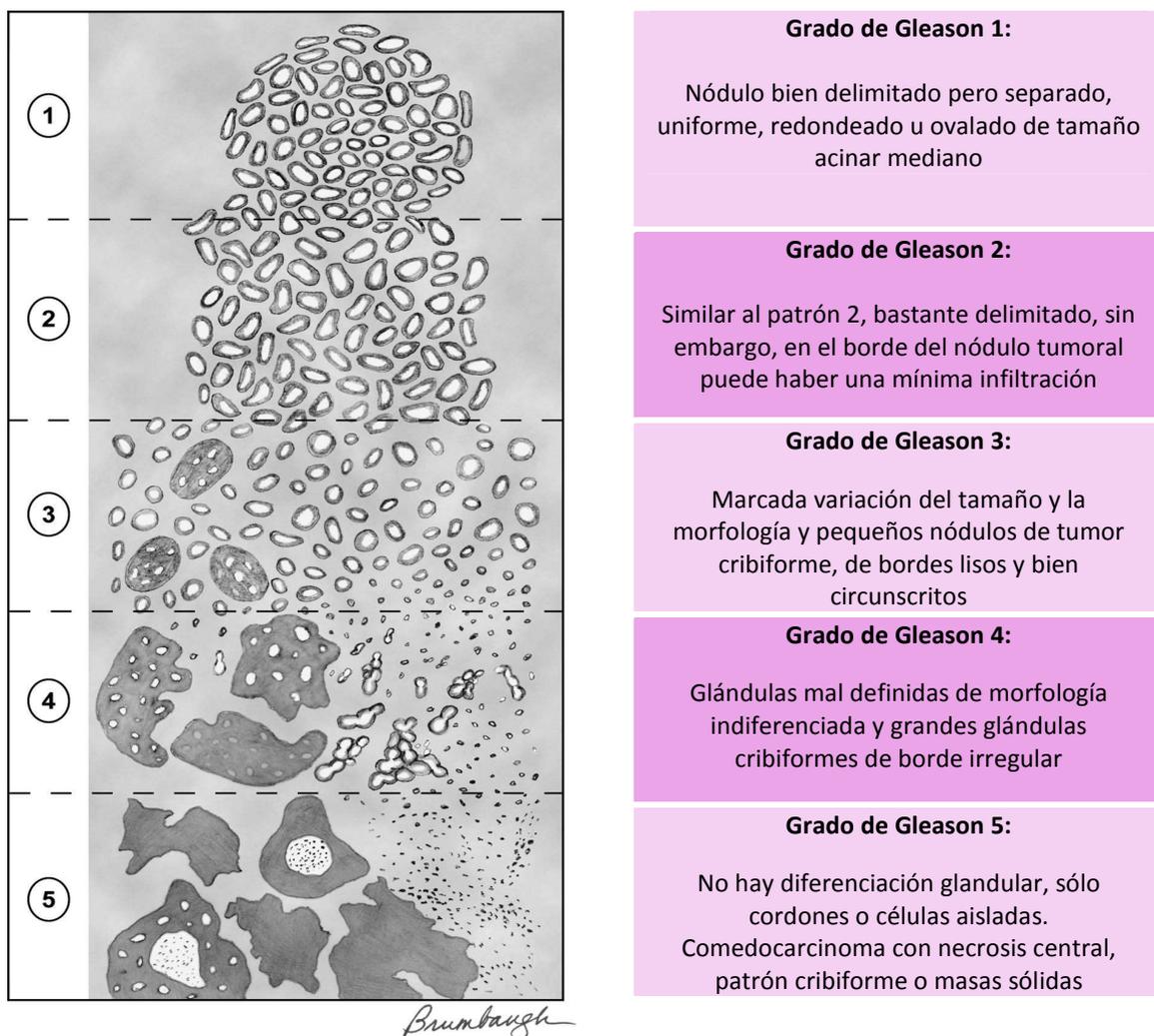
A través de sus estudios sobre la arquitectura celular prostática, el Dr. Donald F. Gleason (figura 3), a mediados de los años sesenta, ideó un sistema de puntuación histológico basado en la heterogeneidad celular inherente del CP⁴⁴. Sin embargo, no fué hasta finales de los años 80 cuando anatomo-patólogos y urólogos expertos recomendaron que se utilizara el método creado por Gleason de manera estandarizada, adquiriendo tal relevancia que, en la actualidad, se considera el sistema de calificación del grado histo-patológico de elección para el CP, por su destacable valor predictivo avalado por numerosos estudios⁴⁵⁻⁴⁸.

Figura 3. **Donald F. Gleason**, *University of Minnesota*. Fuente: Lawrence K. Altman, 2009 [44].



El sistema de Gleason hace referencia a la terminología utilizada por el patólogo para describir la apariencia histológica del CP mediante la identificación de cinco patrones de crecimiento, establecidos según la Sociedad Internacional de Patología Urológica, que responden a una escala progresivamente decreciente de diferenciación de la arquitectura de las glándulas (como se muestra en la **figura 4** y se describe en la **tabla 5**), de modo que, a mayor indiferenciación glandular, mayor grado en la escala y mayor agresividad clínica del CP ⁴⁵⁻⁴⁸.

Figura 4. **Representación** gráfica esquemática de los **Grados de Gleason**. Fuente: International Society of Urological Pathology (ISUP). **Tabla 5. Descripción del Sistema de Gleason Modificado (2005)**. Fuente: International Society of Urological Pathology (ISUP) [45].



La gradación o escala de Gleason nace de la observación de que combinando los dos patrones morfológicos más comunes hallados en un determinado caso, se podía predecir de manera más precisa la conducta del CP^{45,46}. Por tanto, para definir la escala de Gleason el patólogo selecciona los dos patrones histológicos predominantes graduándolos del uno al cinco de manera que la suma o puntuación de ambos puede ir de dos a diez, con las implicaciones pronósticas correspondientes.

El sistema de gradación de Gleason, adoptado en 2005 por la Sociedad Internacional de Patología Urológica⁴⁵, refleja la relación entre el comportamiento biológico del CP y su estructura histológica, constituyendo uno de los factores pronósticos más significativos del CP junto al PSA plasmático y a la estadificación clínica^{46,47}. En un artículo de Albertsen y cols.⁴⁶ se describe la influencia de la gradación de Gleason en el riesgo de progresión y, a largo plazo, en la mortalidad cáncer-específica. Los autores evaluaron las muestras de biopsia mediante la gradación de Gleason y comprobaron que la mortalidad era más alta conforme más alto era el grado de Gleason, tal y como se muestra en la [tabla 6](#).

Tabla 6. Tasas de **mortalidad global** y **mortalidad cáncer-específica** al cabo de 15 años en relación con la **gradación de Gleason** en el momento del diagnóstico en pacientes de 55-74 años con enfermedad órgano-confinada [46,47].

Gradación de Gleason	Tasa de mortalidad global (%)	Tasa de mortalidad cáncer específica (%)
5	6 -11	14
6	18 - 30	44
7	42 - 70	76
8 – 10	60 - 87	93

Muy recientemente (2016) la OMS ha aceptado un nuevo sistema de gradación de Gleason propuesto por Epstein y su equipo⁴⁸, con el objetivo de mejorar la precisión de la estadificación y simplificar las múltiples puntuaciones posibles en función de las combinaciones de los patrones de Gleason, diferenciando mejor cada grupo histológico con la consecuente reducción del sobretratamiento.

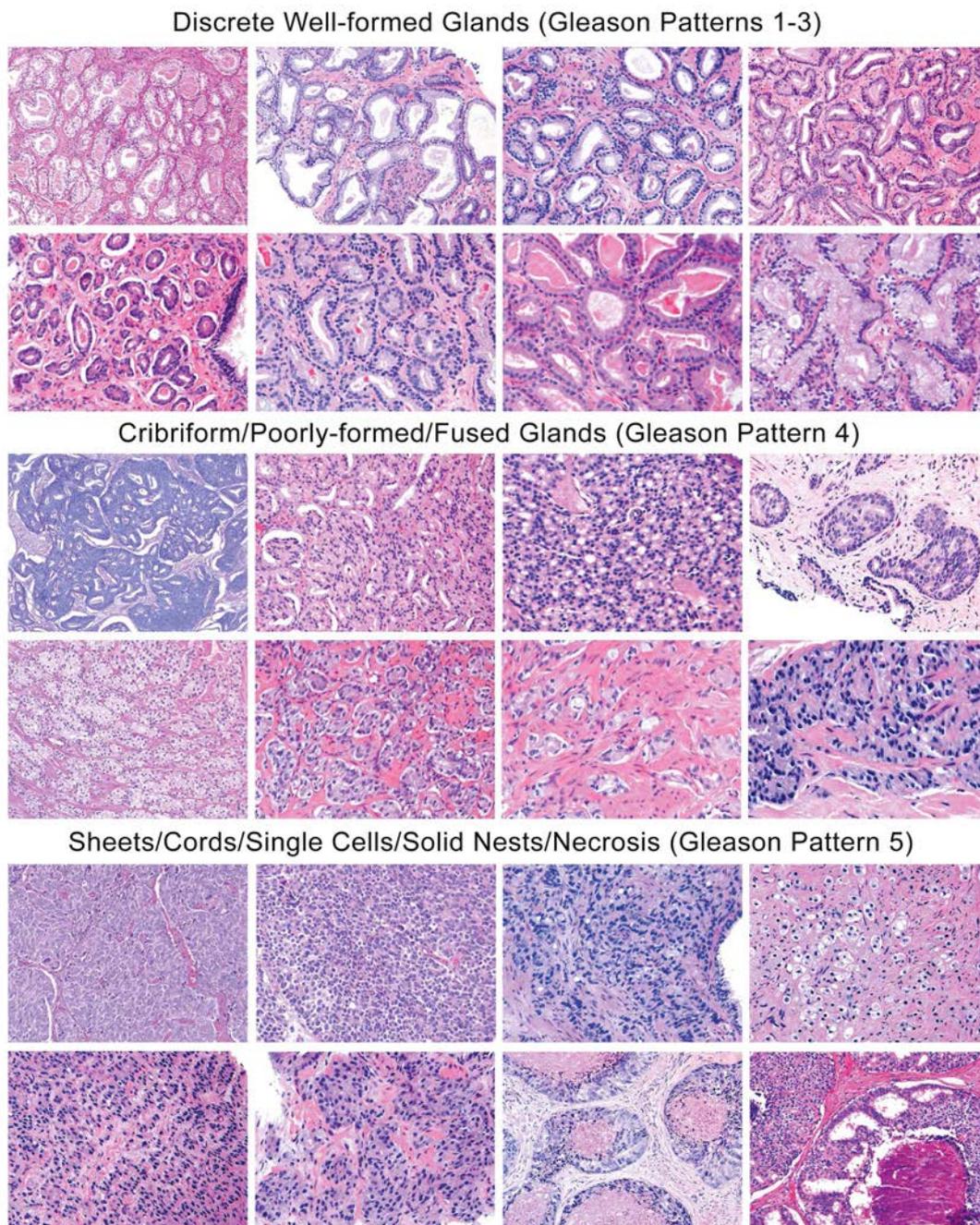
El nuevo sistema consiste en la formación de cinco grupos histológicos, desarrollados a partir del estudio de más de 20.000 varones sometidos a prostatectomía radical⁴⁸. En la [tabla 7](#) se describen las características histo-patológicas de cada grupo histológico.

Tabla 7. **Definición histológica** del nuevo sistema de gradación. Fuente: Traducido de Epstein y cols. 2016 [48].

Grupo histológico	Grado de Gleason	Características histológicas
1	≤ 6	Sólo se observa una pequeña proporción de glándulas neoplásicas bien diferenciadas
2	3 + 4 = 7	Predominan las glándulas neoplásicas bien diferenciadas pero se observan una pequeña parte de glándulas pobremente diferenciadas, fusionadas o de patrón cribiforme.
3	4 + 3 = 7	Predominan las glándulas neoplásicas pobremente diferenciadas con un menor componente de glándulas bien diferenciadas.
4	8	Se forma con combinaciones de grados simples Gleason 4+4, 3+5 o 5+3, es decir, pueden observarse mezclas de proporciones variables de estos patrones: cambios cribiformes, áreas con gran fusión de glándulas entre las que todavía se identifican luces glandulares o áreas con fusión de glándulas pero con mucho estroma entre los grupos de glándulas tumorales.
5	9 -10	Ausencia de glándulas (con o sin necrosis) o presencia de glándulas pobremente diferenciadas, fusionadas o cribiformes o con comedonecrosis central.

En la **figura 5** se muestran los principales rasgos histológicos de los patrones simples de Gleason en los que se basa la nueva clasificación.

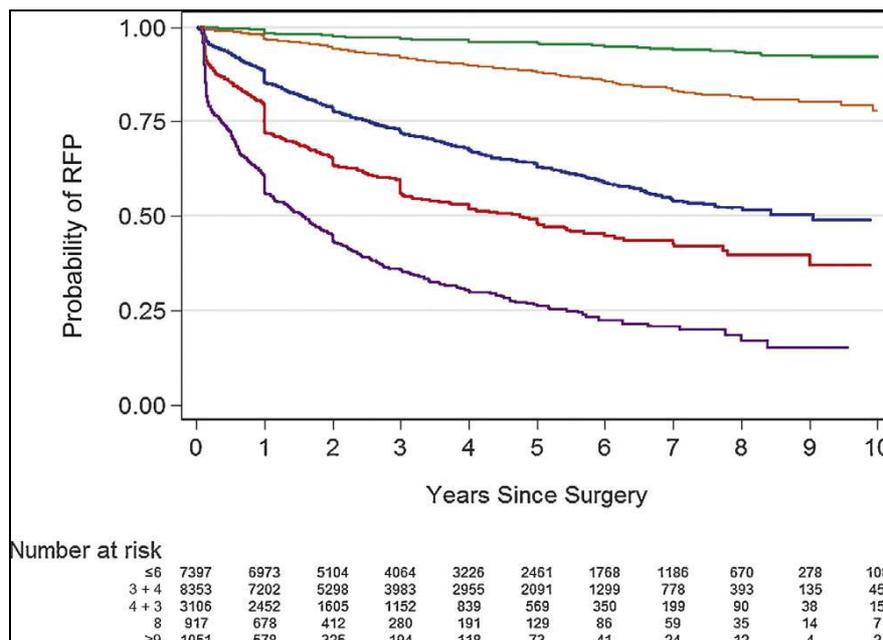
Figura 5. **Rasgos histológicos de la nueva clasificación.** Tinción H&E. De izquierda a derecha. Primera fila: glándulas de tamaño y forma uniforme. Segunda fila: glándulas neoplásicas bien diferenciadas de tamaño y forma variable. Tercera fila: glándulas grandes y cribiformes, algunas fusionadas. Cuarta fila: glándulas pobremente diferenciadas (de núcleo periférico), muchas fusionadas. Quinta fila: Nidos, hojas y cordones de tumor. Sexta fila: Nidos sólidos de cáncer, con comedonecrosis. Fuente: *The Johns Hopkins University. Jonathan Epstein. M.D. Copyright 2013.*



Este nuevo sistema de clasificación permite una mejor categorización pronóstica de los pacientes con respecto al sistema previo y está avalado por otros estudios publicados^{49,50} que también demuestran el excelente pronóstico de los varones con Gleason 6, el peor pronóstico de los pacientes con Gleason 4 + 3 = 7 frente al Gleason 3 + 4 = 7 y el mal pronóstico de aquéllos con puntuaciones de Gleason 9 y 10.

El estudio realizado por Epstein⁴⁸ mostró que la probabilidad de supervivencia libre de recurrencia bioquímica a cinco años tras el tratamiento (prostatectomía radical) por cada grupo, del 1 al 5, fué del 96%, 88%, 63%, 48% y 26%, respectivamente (figura 6).

Figura 6. Probabilidad de progresión libre de recurrencia bioquímica por cada grupo de grado (1-5) según el nuevo sistema de estadificación. Fuente: Epstein y cols. 2016 [48].



Para evitar confusiones es conveniente informar del nuevo sistema de clasificación junto con el sistema de Gleason clásico hasta que esté ampliamente aceptado, p. ej. puntuación de Gleason 3 + 3 = 6 (Grupo 1).

Fracción de cilindros afectados

Se define como la relación entre el número de cilindros en los que el patólogo observa invasión por neoplasia y el número total de cilindros analizados por cada lóbulo prostático⁵¹. Tigrani y cols.⁵² observaron que los pacientes con invasión de 3 o más cilindros obtenidos en la biopsia por sextantes presentaban mayor riesgo de margen quirúrgico afecto. Éste es un dato importante, dado que se correlaciona con factores clínicos, histológicos y postquirúrgicos (mayor riesgo de márgenes afectados, de recidiva bioquímica, de progresión tumoral y de refractariedad a radioterapia de rescate tras cirugía)^{53,54}.

1.2.3.4 Limitaciones de la biopsia

Error en el muestreo

En primer lugar, la BP presenta una limitación en su sensibilidad diagnóstica; según Djavan⁵⁵, las BP conducen frecuentemente a muestras no representativas, en las que sólo se detecta CP en el 30% de los varones con niveles elevados de PSA. Otras series muestran sensibilidades que oscilan entre el 45 al 77%^{56,57}. Tei y su grupo⁵⁸ analizaron la tasa de detección global de CP clínicamente significativo comparando la BP de 12 cilindros con la respectiva pieza quirúrgica de 206 pacientes intervenidos de prostatectomía radical, concluyendo que el 53,6% de los CP significativos no fueron detectados mediante la biopsia inicial. Todo ello apunta a que un conjunto de biopsias negativas no excluye la presencia de CP. Esto puede ser debido a la localización del tumor en zonas de difícil acceso para la BP transrectal: zona anterior, transicional adyacente y zona central⁵⁹ (ver apartado 3.2.2 Glándulas del aparato reproductor masculino).

En segundo lugar, la BP presenta un riesgo de infraestadificación, es decir, puede no detectar CP agresivos⁵⁹, lo cual, puede deberse en gran parte a la multifocalidad inherente del CP observada por varios autores^{60,61}; según el trabajo de Arora⁶¹, el análisis histo-patológico de piezas de prostatectomía radical revela, típicamente, de dos a tres focos de adenocarcinoma, uno de los cuales, llamado tumor índice es, por lo general, de mayor volumen. Sin embargo, los focos de menor volumen pueden presentar mayor grado de indiferenciación que el tumor índice.

En tercer lugar, la BP puede conducir a un sobretratamiento del CP al detectar tumores de muy baja agresividad con los consecuentes efectos secundarios para el paciente^{59,62}.

Morbilidad

La morbilidad de la BP no es infrecuente, tal y como se describe en la guía clínica de CP de la Sociedad Europea de Urología⁶³ (tabla 8). Entre las complicaciones leves destacan la macrohematuria y la hematospermia. La tasa de infecciones graves tras el procedimiento se ha descrito en menos del 1% de los casos pero ha aumentado a consecuencia de las resistencias antibióticas, según una revisión del mismo autor⁶³.

Tabla 8. Frecuencia de **complicaciones** por sesión de **biopsia**, con independencia del número de cilindros de biopsia. Fuente: Traducido de la Guía Clínica de Cáncer de Próstata de la EAU, 2016.

Complicaciones	% de pacientes afectados
Hematospermia	37,4
Hematuria > 1 día	14,5
Rectorragia < 2 días	2,2
Prostatitis	1,0
Fiebre > 38,5°C	0,8
Epididimitis	0,7
Rectorragia > 2 días +/- intervención quirúrgica	0,7
Retención urinaria	0,2
Otras complicaciones que requieran hospitalización	0,3

En conclusión, la información histo-patológica de la BP resulta extremadamente útil para que el urólogo defina una estrategia terapéutica de mayor o menor agresividad, sin embargo, se trata de un procedimiento invasivo no exento de limitaciones.

1.2.4 Nuevos biomarcadores diagnósticos de CP

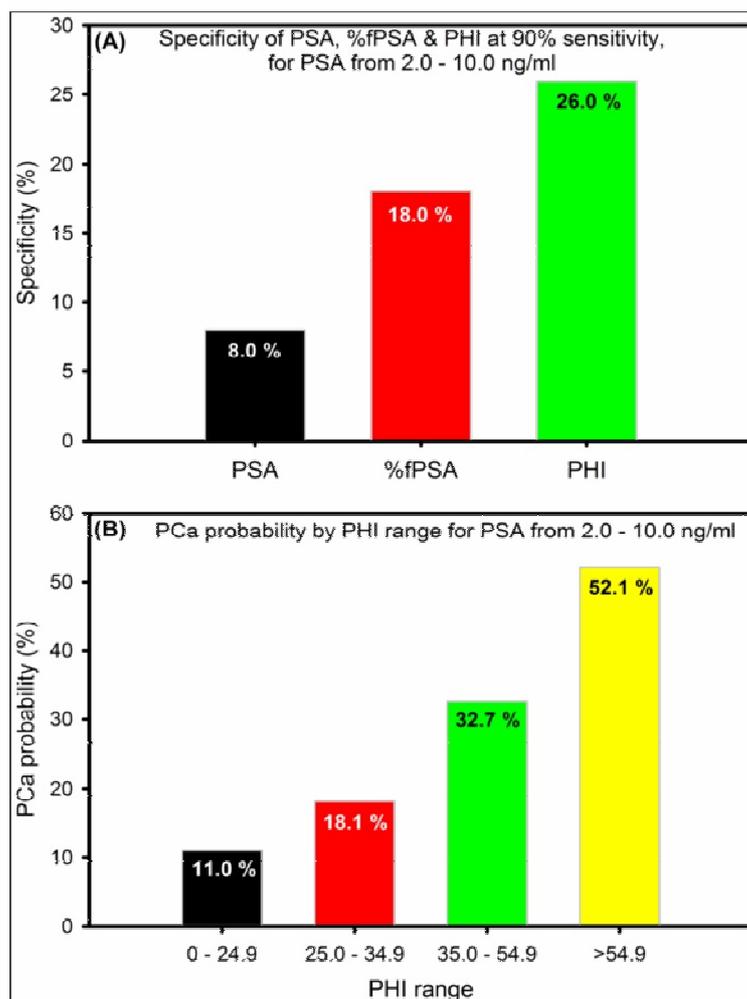
El principal objetivo de la investigación de nuevos biomarcadores diagnósticos de CP es identificar con precisión a los varones con CP agresivo y, en consecuencia, prevenir el sobret ratamiento de aquéllos con CP de menor riesgo de recidiva y progresión clínica. A continuación, se describen los principales biomarcadores de diagnóstico no invasivo de CP disponibles en la actualidad con capacidad de estratificar la enfermedad en base a su agresividad.

1.2.4.1 Nuevos biomarcadores en suero

Índice de Salud Prostático

Prostate Health Index (PHI) o Índice de Salud Prostático es un test diagnóstico aprobado por la FDA desde el año 2012 que utiliza la combinación de los valores plasmáticos del PSA libre, PSA total y la isoforma más estable del PSA (p2PSA) para predecir mejor el riesgo de padecer un CP, ya que, aumenta la sensibilidad diagnóstica del CP en comparación a cualquier otro biomarcador en varones con cifras de PSA entre 2 y 10 ng/ml ^{64,65} (figura 7).

Figura 7. Especificidad y probabilidad de CP según el *Prostate Health Index* (PHI). Fuente: Kanyong, et al, 2016 [65].



Como se observa en la figura, los valores más altos de PHI se asocian con una mayor probabilidad de CP. Además, el PHI se correlaciona con el grado tumoral, es decir, detecta con mayor precisión el CP más agresivo en comparación con el PSA total y la fracción de PSA⁶⁵. No obstante, el beneficio neto que implica su uso en la toma de decisiones clínicas está todavía por determinar.

Marcador 4K

En el marcador 4K o test de las 4 calicreínas prostato-específicas se basa en la cuantificación de cuatro biomarcadores obtenidos a partir de plasma sanguíneo del varón a estudio: PSA total, PSA libre, PSA intacto (isoforma libre de PSA similar al PSA nativo pero sin actividad enzimática) y la peptidasa tipo calicreína humana 2 (hK2)^{62, 66}. Estos cuatro biomarcadores se combinan con determinada información clínica del paciente (edad, presencia de nódulos sospechosos en el TR e historia de BP previa) para calcular, a través de un algoritmo matemático, el riesgo de padecer CP de mal pronóstico en varones con PSA entre 2 y 10 ng/ml⁶⁷. Su uso todavía no está aprobado por la FDA y su principal limitación es el elevado coste económico de la prueba.

1.2.4.2 Nuevos biomarcadores en orina

Marcador PCA 3

Prostate cancer antigen 3 o PCA 3 es un biomarcador detectable en la primera fracción de orina obtenida tras masaje digito-prostático. Se trata de un marcador de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) específico de la próstata de mayor sensibilidad para detectar CP que el PSA total y que la fracción PSA l/t⁶⁸⁻⁷⁰.

Aunque se requieren estudios de coste-efectividad que lo confirmen, la indicación actual del marcador PCA 3 es determinar si es necesario repetir la BP tras una primera BP negativa. Su principal utilidad es, por tanto, ayudar a identificar los casos de CP que la biopsia inicial clasifica erróneamente como sanos⁶⁸⁻⁷⁰. La FDA sólo aprueba el uso de este marcador a partir de la segunda BP, no siendo válido para distinguir CP indolente del agresivo en la BP inicial.

En la [tabla 9](#) se recogen las principales características de los nuevos biomarcadores diagnósticos de CP: Índice de salud prostático, del inglés: *Prostate Health Index* o PHI, test de las 4 calicreínas prostato-específicas o marcador 4K y ensayo *Prostate cancer antigen 3* o PCA3.

Tabla 9. Nuevos test diagnósticos de CP. Fuente: Adaptado de Tonry CL y cols. 2016 [62].

Biomarcador	Tipo de ensayo	Marcadores	Tipo de muestra	Aplicación	Ventajas	Limitaciones
PHI	Inmunoensayo	PSA, PSA libre, p2PSA	Suero sanguíneo	Distingue el CP de patología benigna en varones ≥ 50 años con PSA entre 4 y 10 y TR normal	Ayuda a decidir si está indicada la BP	Acotaciones en su uso en base a la edad y al PSA
					Mejora la especificidad para la detección del CP de mal pronóstico	
					Validación generalizada	
					Aprobado por la FDA	
Marcador 4K	Inmunoensayo	PSA total, PSA libre, PSA intacto, hK2	Suero sanguíneo	Algoritmo que calcula la probabilidad de hallar CP de mal pronóstico en la BP	Ayuda a decidir si está indicada la BP	Coste elevado
					Mejora la especificidad para la detección del CP de mal pronóstico (metastásico)	
					Validación generalizada	No aprobado por la FDA
					Aplicable a pesar de la edad, el PSA u otros hallazgos clínicos	
PCA 3	ARN in vitro (técnica de amplificación genética)	PSA y ARNm del PCA3	Orina tras masaje dígito-prostático	Indicado en varones ≥ 50 años tras 1ª BP negativa	Ayuda a decidir si está indicada la 2ª BP	Sólo aprobado por FDA en caso de repetir la BP
					Validación generalizada	No válido en una 1ª BP para distinguir CP indolente del agresivo
					Aprobado por la FDA	Se requiere masaje dígito-prostático

PHI=Prostate Health Index; PSA=prostate-specific antigen; p2PSA=isoforma p2 prostate-specific antigen; CP=cáncer de próstata; TR=tacto rectal; BP=biopsia de próstata; hK2=human kallikrein-related peptide 2; FDA=Food and Drug Administration; PCA 3=Prostate cancer antigen 3; ARN=ácido ribonucleico; ARNm=ácido ribonucleico mensajero.

1.2.5 Nuevas técnicas de diagnóstico por la imagen

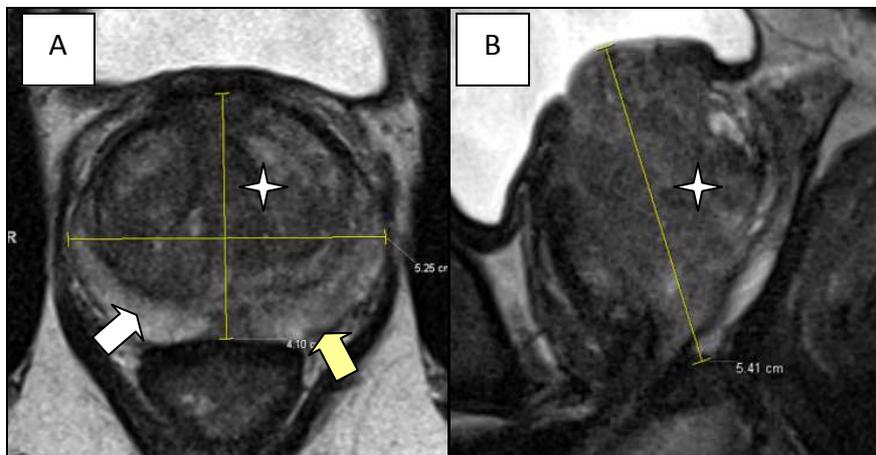
El uso de la resonancia magnética (RM) como técnica diagnóstica en CP nace a partir de la baja rentabilidad de los parámetros clásicamente utilizados para detectar CP (PSA, TR y biopsia prostática), ya que, como se ha expuesto anteriormente, el PSA es altamente inespecífico, el TR poco sensible y el muestreo sistemático de la BP puede obviar CP agresivos.

1.2.5.1 Definición de la RM multiparamétrica

Actualmente existe gran interés en la RM denominada multiparamétrica (RMmp). Como su nombre indica, a través de la interpretación de diferentes parámetros o secuencias permite obtener información anatómica y funcional de la glándula prostática⁷¹.

La información anatómica se extrae de las secuencias morfológicas T1 y T2; ambas tienen gran utilidad en la valoración de la extensión local del CP⁵⁹. La secuencia T1 permite valorar posibles adenopatías pelvianas o metástasis óseas pélvicas y la secuencia T2 se centra en las diferentes zonas de la próstata (periférica, central, fibromuscular anterior y cápsula) y en las vesículas seminales (figura 8).

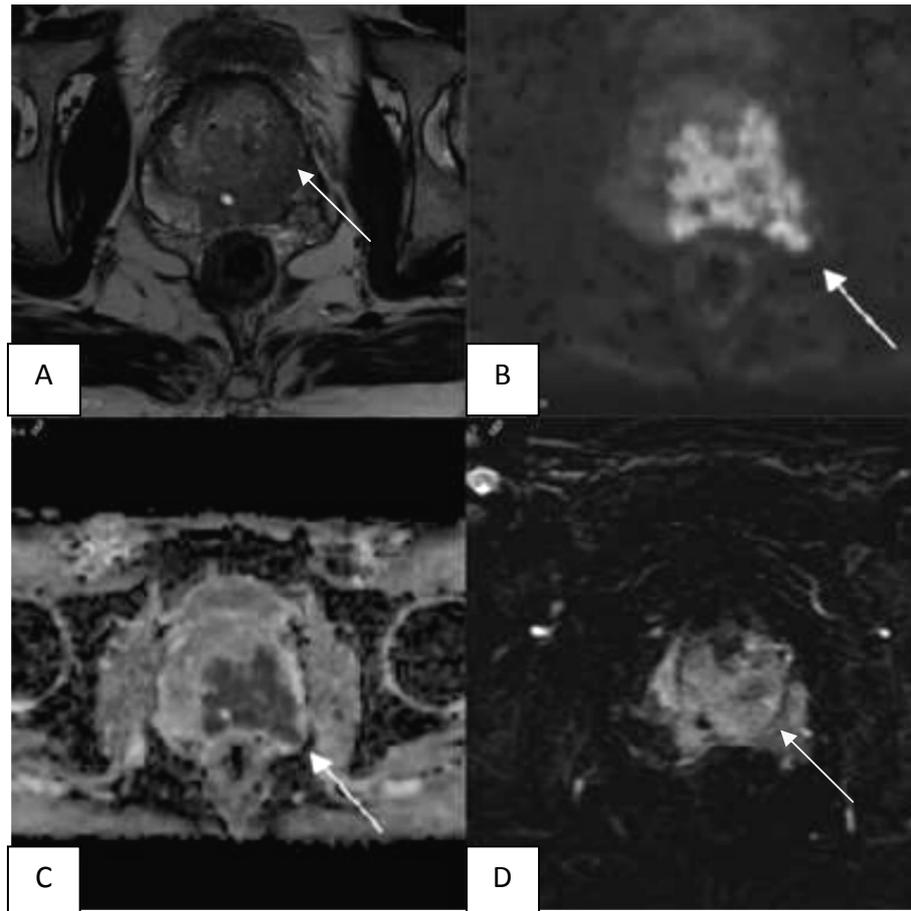
Figura 8. RM multiparamétrica: secuencia anatómica T2. A) Plano axial donde se observa la zona periférica hiperintensa (flecha blanca), zona transicional de señal heterogénea (+) y cápsula (flecha amarilla). B) Plano sagital con zona transicional señalada (+). Fuente: Guías de la Sociedad Europea de Radiología Urogenital (*European Society of Urogenital Radiology Guideline*).



La información funcional se obtiene de la secuencia de difusión y de la secuencia dinámica contrastada. La secuencia de difusión evalúa la restricción al movimiento de difusión de las moléculas libres de agua en el espacio intersticial y a través de la membrana celular, aportando información sobre la densidad y el grado de organización glandular⁵⁹. Se sabe que el tejido neoplásico tiene mayor restricción a la difusión, es decir, menor movimiento de las moléculas que el tejido sano y que, además, a mayor agresividad neoplásica la restricción todavía es mayor, ya que, los cambios arquitecturales y la densidad celular aumentan⁷². Por tanto, en base a las imágenes de la RMmp es posible predecir el grado de agresividad tumoral del CP (figura 9). Sin embargo, lesiones benignas también pueden condicionar restricción a la difusión.

La secuencia dinámica contrastada se basa en el análisis de las imágenes de la próstata y de las vesículas seminales tras la administración intravenosa de contraste (gadolinio). El tejido canceroso suele captar precozmente el contraste a la vez que lo elimina más rápidamente que el tejido sano⁷¹ (figura 9).

Figura 9. **RM multiparamétrica: secuencia anatómica T2 y secuencias funcionales.** Paciente de 72 años con PSA de 1,5 ng/ml y tacto rectal patológico en lóbulo izquierdo. A) **Secuencia T2** que muestra hipointensidad que ocupa ampliamente la zona periférica y transicional del lóbulo izquierdo y parte de la zona periférica derecha. B y C) **Secuencias de difusión** que muestran gran restricción a la difusión en la zona problema descrita en la secuencia T2. D) **Secuencia dinámica** tras la administración de contraste, donde se observa una captación precoz en la zona problema respecto al resto de la glándula. La RMmp reportó CP estadio T3a con probable puntuación de Gleason superior a 7, hallazgos confirmados tras prostatectomía (estadio pT3a Gleason 4+5). Fuente: Català V y cols. 2016.



1.2.5.2 Modelo de lectura de la RM multiparamétrica

En el año 2012, expertos de la Sociedad Europea de Radiología Urogenital (del inglés: *European Society of Urogenital Radiology*, ESUR) propusieron un modelo de lectura semiobjetivo que integraba la información obtenida de las diferentes secuencias de la RMmp con la probabilidad de detectar un CP en una escala del 1 al 5 (de muy baja a muy alta probabilidad). Para ello, se creó el modelo *Prostate Imaging Reporting and data System* o PIRADS⁷³ (tabla 10) y su versión actualizada y consensuada por la ESUR denominada PIRADS versión 2⁵⁹.

Tabla 10. Modelo cualitativo de *Prostate Imaging Reporting and data System* o PIRADS. Adaptada de: Barentsz JO y cols. 2012 [73]

PIRADS 1	La existencia de CP clínicamente significativo es muy poco probable
PIRADS 2	La existencia de CP clínicamente significativo es poco probable
PIRADS 3	La presencia de CP clínicamente significativo es equívoca
PIRADS 4	Es probable la existencia de CP clínicamente significativo
PIRADS 5	Es muy probable la existencia de CP clínicamente significativo

1.2.5.3 Utilidad de la RM multiparamétrica en el diagnóstico de CP

Varios estudios han avalado el papel de la RMmp en el diagnóstico de CP; Moore [74] realizó una revisión sistemática de la literatura comparando la BP guiada por RMmp versus la BP sistemática, concluyendo que ambas modalidades detectaban CP de manera similar, aunque la RMmp evitaba un tercio de las BP realizadas (BP negativas) gracias a la visualización de las lesiones sospechosas.

Mozer y su grupo⁷⁵ estudiaron varones con PSA elevado sin BP previa y hallaron que la RMmp permitía al radiólogo dirigir la BP ecoguiada a zonas de alta sospecha de CP (previsualizadas en la RMmp), detectando mayor número de CP agresivos y menor número de CP indolentes en comparación con la BP sistemática de 12 cilindros. Ello se debe, en gran parte, a que la secuencia de difusión puede precedir el grado histopatológico final hallado en la pieza de prostatectomía⁷⁶ (figura 9). Por otro lado, numerosos autores avalan el papel de la RMmp en el diagnóstico de CP en varones con sospecha de cáncer (cifras elevadas de PSA) pero BP inicial y/o de repetición negativas; Lista y cols.⁷⁷ obtuvieron que la RMmp era un predictor independiente para positividad de CP en la segunda BP.

1.2.5.4 Limitaciones de la RM multiparamétrica en el diagnóstico de CP

Como todo parámetro diagnóstico, la RMmp presenta limitaciones: en primer lugar, la interpretación de las imágenes es subjetiva y está sujeta a variabilidad entre lectores; por ello, su modelo de lectura inicial (PIRADS) tuvo que modificarse dando lugar a una nueva versión (PIRADS versión 2) que requiere seguir siendo evaluada⁵⁹. En segundo lugar, la RMmp como técnica de uso generalizado está limitada por su alto coste y tiempo requerido de exploración, siendo necesarios estudios a largo plazo que evalúen su rentabilidad.

1.3 Estadificación y grupos de riesgo de CP

La estadificación del CP es una metodología estandarizada de clasificación de los tumores prostáticos basándose en la localización tumoral en la propia glándula y en la presencia o ausencia de extensión tumoral local (a estructuras adyacentes), regional (al drenaje linfático ganglionar) y/o a distancia (metástasis). La [tabla 11](#) recoge la estadificación vigente de CP según la clasificación TNM (Tumor-Ganglios-Metástasis) de 2009⁷⁸⁻⁷⁹.

Tabla 11. **Clasificación TNM** (Tumor-Ganglios-Metástasis) del CP. Fuente: Tomado de la Guía Europea de Urología. Versión 2014 (traducción al castellano).

M - Metástasis a distancia*	
MX	No se pueden evaluar las metástasis a distancia
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	Ganglios linfáticos no regionales
M1b	Huesos
M1c	Otros focos
<p>¹ Un tumor hallado en uno o ambos lóbulos mediante una biopsia por punción, pero que no es palpable ni visible en las pruebas de imagen, se clasifica como T1c.</p> <p>² La invasión del vértice de la próstata, o de la cápsula prostática (pero sin sobrepasarla), no se clasifica como pT3, sino como pT2.</p>	
T - Tumor primario	
TX	No se puede evaluar el tumor primario
T0	Ausencia de datos de tumor primario
T1	Tumor clínicamente inaparente no palpable ni visible en las pruebas de imagen
T1a	El tumor es un hallazgo histológico fortuito en el 5 % o menos del tejido resecaado
T1b	El tumor es un hallazgo histológico fortuito en más del 5 % del tejido resecaado
T1c	Tumor identificado en una biopsia por punción (por ejemplo, debido a una concentración elevada de antígeno prostático específico [PSA])
T2	Tumor limitado a la próstata ¹
T2a	El tumor afecta a la mitad de un lóbulo o menos
T2b	El tumor afecta a más de la mitad de un lóbulo, pero no a los dos lóbulos
T2c	El tumor afecta a los dos lóbulos
T3	El tumor se extiende a través de la cápsula prostática ²
T3a	Extensión extracapsular (uni o bilateral), incluida la afectación microscópica del cuello de la vejiga
T3b	El tumor invade una o ambas vesículas seminales
T4	El tumor está fijo o invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales: esfínter externo, recto, músculos elevadores o pared de la pelvis
N - Ganglios linfáticos regionales³	
NX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	Ausencia de metástasis ganglionares regionales
N1	Metástasis ganglionares regionales

La estadificación del CP puede ser clínica o histo-patológica. La estadificación clínica de un CP en concreto se realiza previo tratamiento mediante datos clínicos, como el TR, y pruebas de imagen, como la ecografía transrectal y la RM. Por contra, la estadificación patológica requiere identificación histológica de la extensión tumoral en la glándula prostática y en órganos adyacentes, de manera que, se suele dictaminar una vez realizado el tratamiento quirúrgico.

Como se describe en la [tabla 11](#), los tumores estadio T1 están limitados a la próstata pero, a diferencia del resto de estadios, no son clínicamente palpables al TR ni visibles por estudios de imagen, sino que se diagnostican de manera incidental por resección transuretral de próstata, o bien, por sospecha clínico-analítica mediante BP. Los tumores estadio T2 también están confinados al órgano pero pueden detectarse clínicamente mediante TR y se subdividen según afecten a uno o a ambos lóbulos. El estadio T3 hace referencia a tumores localmente avanzados, es decir, que se extienden más allá de los límites de la próstata invadiendo la cápsula prostática y/o las vesículas seminales. Finalmente, el CP en estadio T4 invade o se fija a otros órganos pélvicos⁷⁸.

La información que proporciona la estadificación es crucial para:

- a) Determinar la extensión del tumor en el momento del diagnóstico.
- b) Evaluar el pronóstico del paciente, es decir, el riesgo de recurrencia y progresión del CP.
- c) Planificar de manera adecuada el tratamiento.
- d) Comparar los resultados del tratamiento entre diferentes instituciones⁸⁰.

Además de una correcta estadificación, es necesario realizar una estimación del riesgo de progresión del CP al tratamiento. En 1998, D'Amico⁸¹ diseñó unos grupos de riesgo de progresión basados en tres parámetros de influencia pronóstica independiente (PSA total, estadificación clínica y grado de Gleason de la BP)⁸². D'Amico⁸¹ empleaba estos parámetros para clasificar a los pacientes en tres grupos o estratos según su riesgo de progresión al tratamiento, utilizando valores de corte específicos que permitían orientar en las decisiones de tratamiento⁸³. De esta forma, un paciente con PSA < 10 ng/ml, Gleason < 7 y estadio T1-2a se consideraba de bajo riesgo de progresión de la enfermedad; si el PSA era entre 10-20 ng/ml, el Gleason 7 o el estadio T2b el riesgo era intermedio, y si el PSA era > 20 ng/ml, el Gleason 8-10 o el estadio > T2c el riesgo de progresión era alto (tabla 12). Además de ser validada, esta clasificación se caracteriza por ser práctica, sencilla, reproducible y por contar con el respaldo de asociaciones como la NCCN y la EAU, con algunas adaptaciones (tabla 12).

Tabla 12. Grupos de riesgo del CP localizado y localmente avanzado. Fuente: D'Amico y cols. 1998 [81], traducido de la *European Guidelines of Urology, EAU* (2016) y traducido de la *National Comprehensive Cancer Network, NCCN Guidelines* (2016).

Sistemas de Clasificación	Riesgo muy bajo	Riesgo Bajo	Riesgo intermedio	Riesgo alto	Riesgo muy alto / Localmente avanzado
D'Amico 1998		PSA ≤ 10ng/ml y Gleason <7 y cT1-2a	PSA 10-20 ng/ml o Gleason ≤7 o cT2b	PSA > 20 ng/ml o Gleason >7 o cT2c-3a	
NCCN 2016	cT1c, Gleason ≤6, PSA <10ng/ml, <3 cilindros positivos con ≤ 50% afectación por cilindro	PSA <10ng/ml, Gleason ≤6, cT1-2a	PSA 10-20 ng/ml o Gleason 7 o cT2b-2c	PSA > 20 ng/ml o Gleason 8-10 o cT3a	Cualquier PSA, cT3b-4, patrón primario de Gleason 5, > 4 cilindros con Gleason 8-10, cualquier T con N1 y M0
EAU 2016		PSA <10ng/ml, Gleason <7, cT1-2a	PSA 10-20 ng/ml o Gleason 7 o cT2b	PSA > 20 ng/ml o Gleason > 7 o cT2c	Cualquier PSA, cualquier Gleason y cT3-4 o cN+

2. ESTRÉS OXIDATIVO

2.1 Definición bioquímica. Homeostasis REDOX: producción y eliminación de especies reactivas de oxígeno (ERO)

El término “estrés oxidativo” hace referencia a un estado celular, en el cual, se encuentra alterada la homeostasis reducción-oxidación (REDOX), es decir, el balance entre pro-oxidantes y antioxidantes. Este desbalance se debe a una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y/o a un déficit de los mecanismos antioxidantes, conduciendo a daño un celular⁸⁴.

La estructura electrónica de un átomo o de una molécula es termodinámicamente más estable si en cada orbital hay un máximo de dos electrones que giran en direcciones opuestas, es decir, que se hallan apareados. La mayoría de las sustancias presentes en el organismo contienen electrones apareados y suelen ser, por tanto, químicamente estables. En la [figura 10](#) se representa el átomo de oxígeno según el modelo de Bohr⁸⁵.

Las ERO, también conocidas como agentes oxidantes, son un grupo de moléculas derivadas del oxígeno que contienen uno o más electrones desapareados, lo cual, les confiere una enorme reactividad química, ya que, tienden a interactuar rápidamente con otros átomos o moléculas para estabilizar su órbita externa⁵⁷. Las principales ERO son: el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^\cdot). En la [figura 11](#) se muestra un esquema de la estructura de la molécula de oxígeno y del anión superóxido.

Figura 10. **Estructura atómica del oxígeno**, según el modelo de Bohr. El físico danés postuló que los electrones giran alrededor del núcleo disponiéndose en diversas órbitas circulares, las cuales, determinan diferentes niveles de energía [85].

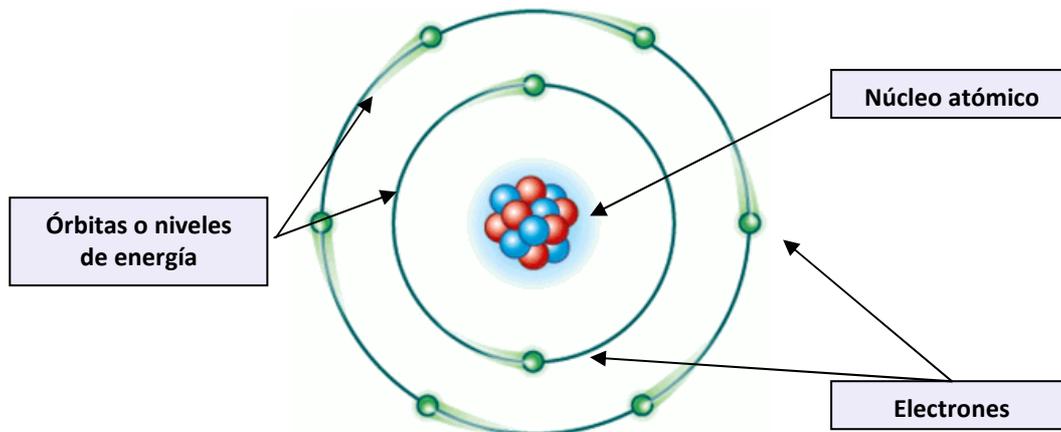
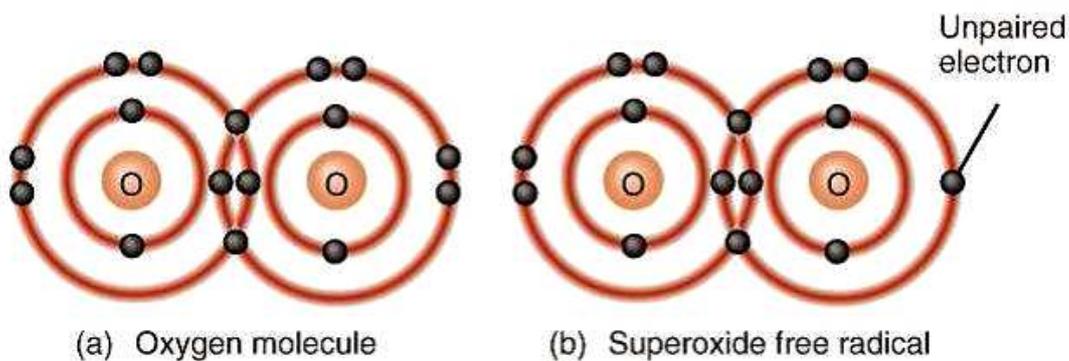


Figura 11. Esquema de la estructura de la **molécula de oxígeno (O_2)** y del **anión superóxido (O_2^-)**. Ésta última contiene un electrón no apareado en su orbital externo, convirtiéndose en muy reactiva, ya que, necesita estabilizar su órbita externa aceptando un electrón de otras moléculas. Fuente: *John Wiley & Sons, Incorporated. Copyright 2014.*



Las ERO son productos comunes del metabolismo celular aeróbico estándar y se producen continuamente en la célula, a la vez, que se eliminan a través de una gran variedad de mecanismos antioxidantes⁸⁶. Existen fuentes de formación de ERO intracelular, tanto exógenas: radiación y otros agentes medioambientales, como endógenas: microsomas, granulocitos, peroxisomas y la mitocondria, considerada esta última una de las principales fuentes⁸⁶.

Paschos y cols.⁸⁴ identificaron a la familia de enzimas NADPH-oxidasa como fuente importante de ERO en múltiples procesos de carcinogénesis, incluyendo el CP.

En la [tabla 13](#) se señalan los principales factores que promueven el estrés oxidativo según Paschos⁸⁴ y los mecanismos moleculares donde, concretamente, se producen las ERO.

Tabla 13. **Condiciones** que promueven el **estrés oxidativo**. Fuente: adaptado de Paschos y cols. 2013 [84].

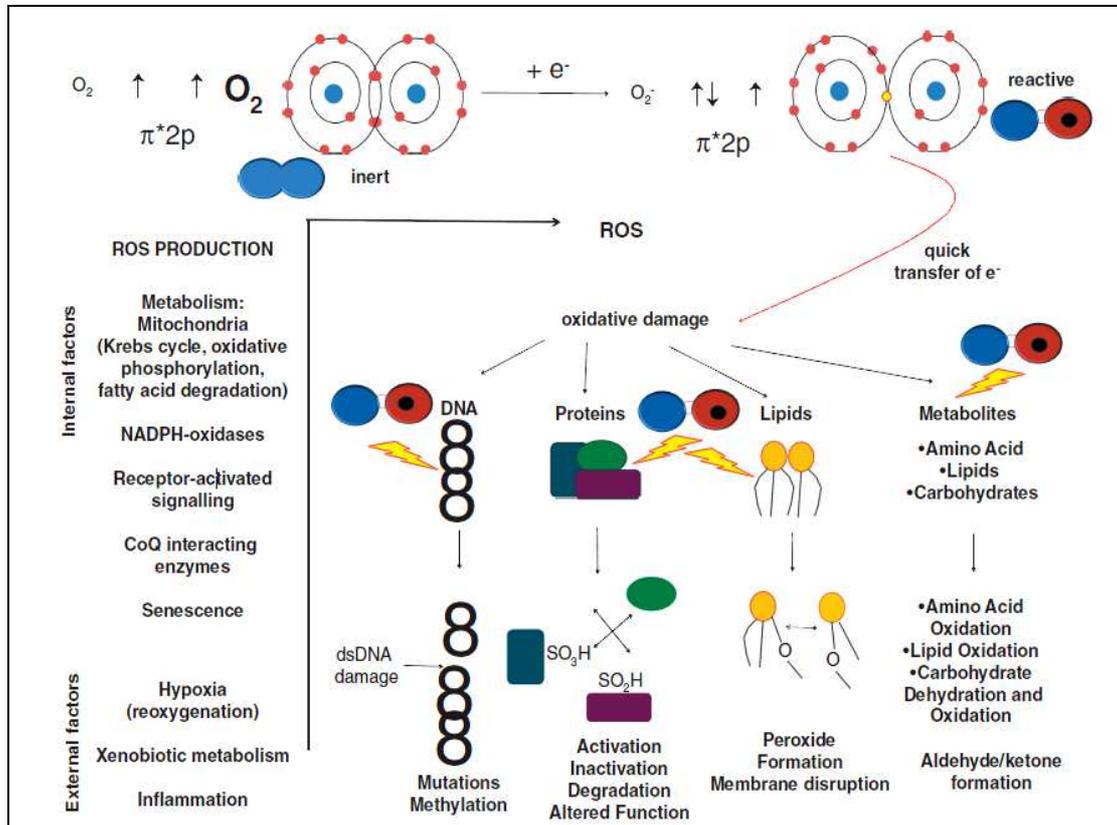
Condición	Producción de ERO
Hipoxia	Mitocondria, NADPH oxidasas (células no fagocíticas), xantina oxidasa, nítrico oxidasa
Mutaciones del ADN mitocondrial	Mitocondria
Alteraciones metabólicas	Mitocondria
Activación de receptores (andrógenos, hormonas esteroideas) y cambios hormonales	NADPH oxidasas (células no fagocíticas), mitocondria, nítrico-oxidasa
Metabolismo xenobiótico	NADPH oxidasas (células no fagocíticas), mitocondria, nítrico-oxidasa
Inflamación (prostatitis bacteriana y no bacteriana)	NADPH oxidasas (células fagocíticas), mieloperoxidasa, nítrico-oxidasa

NADPH = nicotinamida adenina dinucleótido; ADN= Ácido desoxirribonucleico

2.2 Relación entre estrés oxidativo y CP

Numerosos estudios experimentales y clínicos^{84,87-89} evidencian que el estrés oxidativo se asocia al desarrollo de cáncer, a través del daño del ADN, proteínas y lípidos, tal y como se representa en la [figura 12](#).

Figura 12. Cuando la **molécula de oxígeno (O₂)** acepta un solo electrón, se convierte en una **especie reactiva de oxígeno (ERO)**. Las ERO puede dañar el ADN, proteínas y lípidos celulares, dando lugar a mutaciones y otros cambios estructurales que favorecen la carcinogénesis. Fuente: Paschos y cols. 2013 [84].



ROS = reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno); CoQ = coenzima Q10; ds = doble cadena; DNA = deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

A continuación, se presentan los principales mecanismos por los que el estrés oxidativo puede dar lugar al CP.

2.2.1 Mutaciones del ADN nuclear

Se ha observado que la mayor fuente de daño endógeno del ADN es la presencia de ERO generadas por el metabolismo celular⁹⁰. A diferencia de las proteínas, lípidos y ARN, el ADN no puede ser reemplazado cuando se daña su estructura, por lo que tiene de ser reparado de inmediato, ya que, el ADN mutado por daño oxidativo puede conducir, directamente, a la activación de oncogenes o a la inactivación de genes supresores de tumores⁹¹.

2.2.1.1 Alteración de la función proteica

Las ERO también pueden dar lugar a mutaciones del ADN nuclear de manera indirecta, a través de la alteración en la función proteica⁹²:

- La mutación proteica modula la señalización celular, pudiendo activar genes que promuevan la supervivencia, progresión y el potencial de metastatizar⁹². Muchos factores de transcripción involucrados en el CP como el NF-κB, AP-1, HIF-1 y p53 son sensibles a los procesos REDOX.
- La autofagia y los eventos no apoptóticos de muerte celular también se activan a través de ERO y son ejecutados mediante catepsinas; proteínas que ejercen un rol en la iniciación y progresión de numerosas neoplasias, incluyendo el CP⁹³.
- El estrés oxidativo también se ha correlacionado con el potencial invasor y de metástasis del CP; se ha observado que la sobreexpresión de la proteína de membrana tipo 1 metaloproteasa (MT1-MMP) en células malignas prostáticas, a través de la inducción de un incremento de los niveles de ERO, da lugar a un fenotipo de CP más agresivo⁹⁴.

En líneas celulares de CP también se ha observado que la sobreexpresión de dicha proteína se asocia a la resistencia a la castración⁹⁴.

2.2.1.2 Inactivación de genes antioxidantes

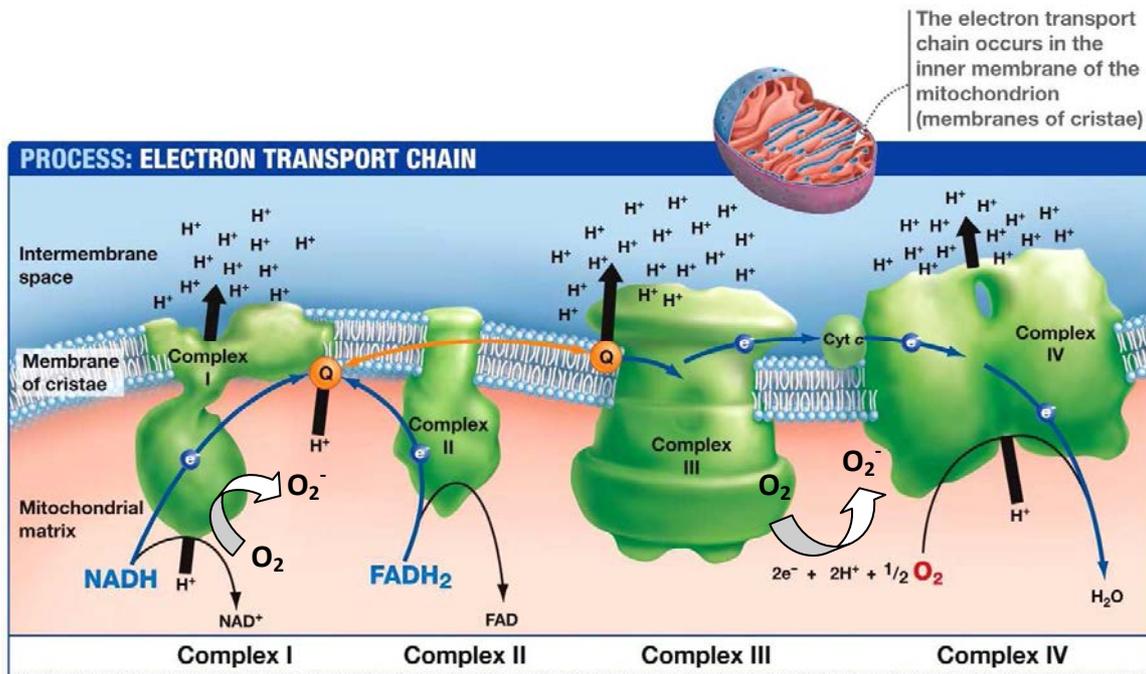
En comparación con el epitelio de la HBP, la expresión proteica de algunos antioxidantes enzimáticos, como la catalasa y la superóxido-desmutasa, se halla reducida en la neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y en el CP^{87,88}.

En el CP existe una expresión disminuída de glutatión (GSH)-S-transferasa P1 (GSTP1) y de factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nrf2), los cuales desarrollan un importante rol en los procesos de detoxificación de ERO⁹⁵. También se ha observado una hipermetilación de ambas enzimas en el modelo animal de ratón afecto de CP, lo cual, reduce drásticamente la capacidad celular antioxidante⁸⁹.

2.2.2 Alteración del metabolismo mitocondrial y cambios relacionados con la edad

Durante el metabolismo oxidativo de la mitocondria la mayor parte del oxígeno se convierte en agua, pero de un 0,2% a un 2% se convierte en ERO⁹⁶. La pérdida de electrones del oxígeno tiene lugar en los complejos respiratorios I y III de la mitocondria, produciéndose anión superóxido (O_2^-), tal y como se representa en la **figura 13**.

Figura 13. Producción de **anión superóxido (O_2^-)** en la cadena respiratoria mitocondrial de transporte de electrones. Fuente: Pearson Education, Incorporated. Copyright 2011.



$NADH$ = Nicotinamida adenina dinucleótido; $FADH_2$ = Flavín adenín dinucleótido; Cyt = citocromo c oxidorreductasa

La teoría del envejecimiento mitocondrial propone que las mutaciones causadas por ERO en el ADN mitocondrial se acumulan en la célula con la edad, dando lugar a proteínas defectuosas de la cadena respiratoria generando, de este modo, mayores niveles de ERO que, a su vez, provocan una mayor tasa de mutaciones⁹⁷.

También se ha descrito relación entre las alteraciones mitocondriales metabólicas y moleculares y el cáncer en humanos. Un estudio reciente revela que mutaciones en el ADN mitocondrial pueden contribuir a la capacidad de metástasis de las células tumorales⁹⁸.

Por tanto, el acúmulo de mutaciones del ADN mitocondrial parece ser un indicador, tanto de procesos del envejecimiento humano (debido al aumento del estrés oxidativo celular), como de procesos de carcinogénesis, incluyendo el CP.

2.2.3 Inflamación crónica y CP

La inflamación crónica y la infección parecen estar implicadas en la patogénesis del cáncer de colon, esófago, estómago, vejiga e hígado pero, hasta ahora, no está demostrado en el CP⁹⁹.

En los procesos de inflamación crónica se produce, de manera característica, un reclutamiento tisular de células fagocíticas que, a través de sus enzimas mieloperoxidasa y NADPH oxidasa, contribuyen al incremento de ERO con el fin de eliminar la noxa causante. Este proceso puede hallarse potenciado por la secreción de citocinas¹⁰⁰.

Klein y cols.¹⁰⁰ sugieren que los cambios pro-oxidativos en el microambiente de la próstata durante la inflamación crónica puede que no sean suficientes para promover la carcinogénesis pero, combinados con la susceptibilidad genética y con sus efectos sobre los genes antioxidantes, como GSPT1 y enzimas reparadoras del ADN, podrían llegar a inducir CP.

3. LÍQUIDO SEMINAL

3.1 Composición

3.1.1 Glándulas del aparato reproductor masculino

La próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales son las glándulas accesorias del aparato reproductor masculino encargadas de la producción del semen o líquido seminal. En las **figuras 14 y 15** se representa su descripción anatómica, según Anson y McVay ¹⁰¹.

Figura 14. **Glándulas accesorias del aparato reproductor masculino: visión posterior (a), sagital media (b), anterior (c) e inferior (d)** de la próstata y de las vesículas seminales y sus relaciones anatómicas con los órganos escroto-peneanos. Fuente: Anson y McVay, 1971 [101].

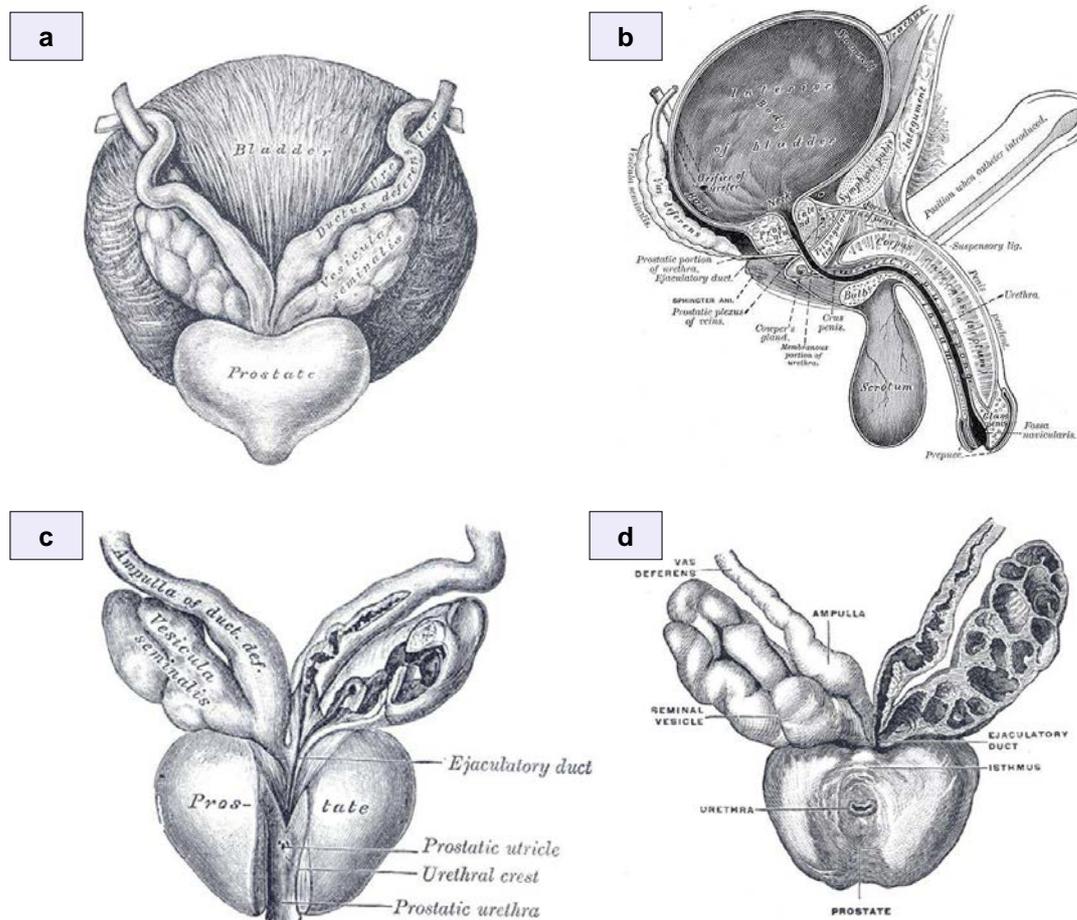
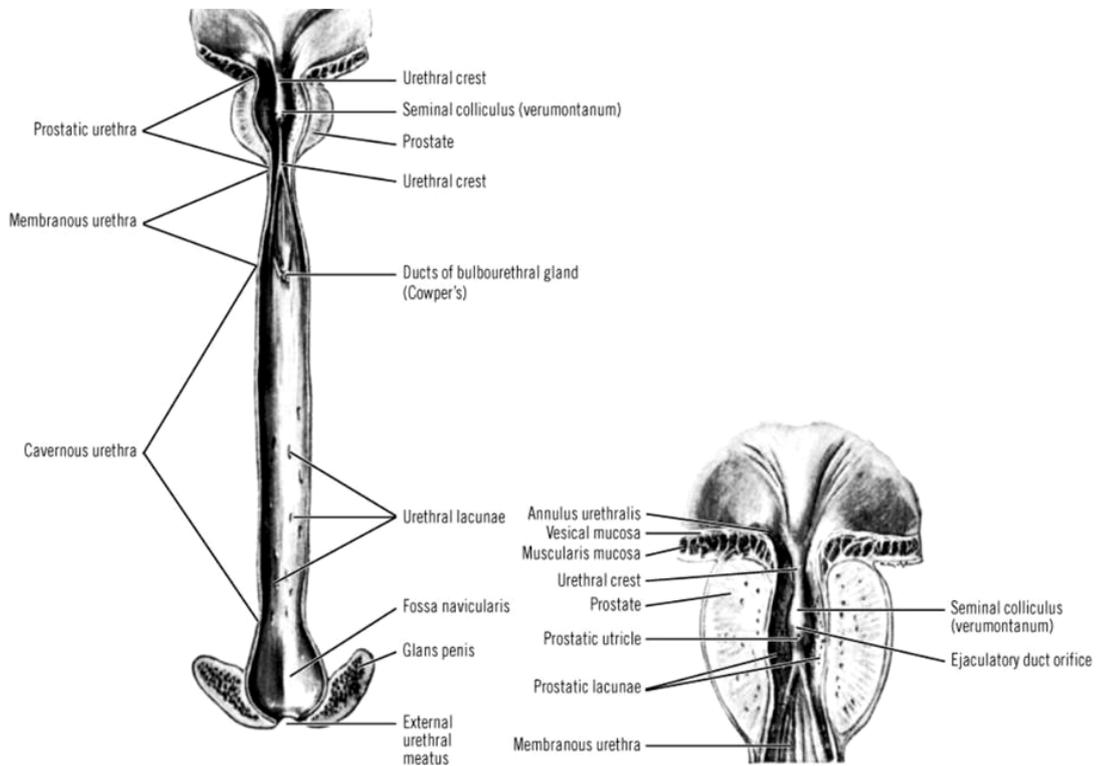
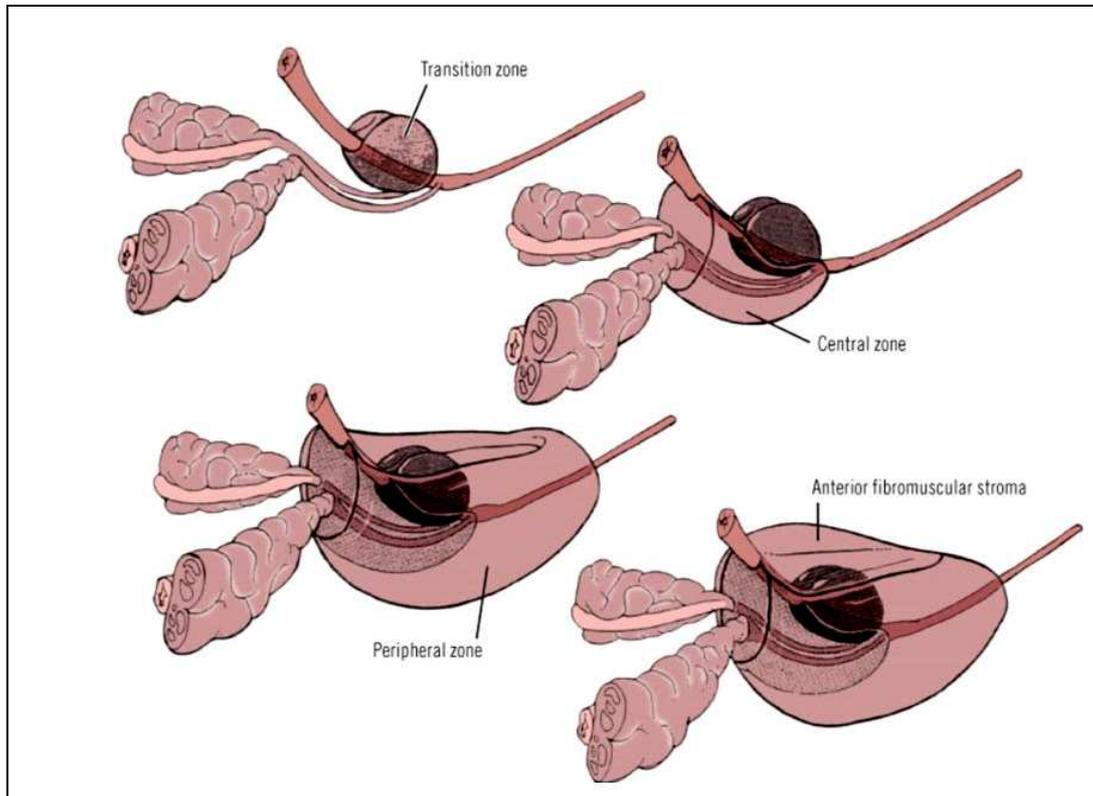


Figura 15. **Glándulas accesorias del aparato reproductor masculino:** visión del cuello de la vejiga y de la porción posterior de la uretra. Se muestra detalle anatómico estructural de la uretra prostática. Fuente: Anson y McVay Anatomía Quirúrgica, 6ª Ed. Vol. II. Filadelfia: WB Saunders, 1984.



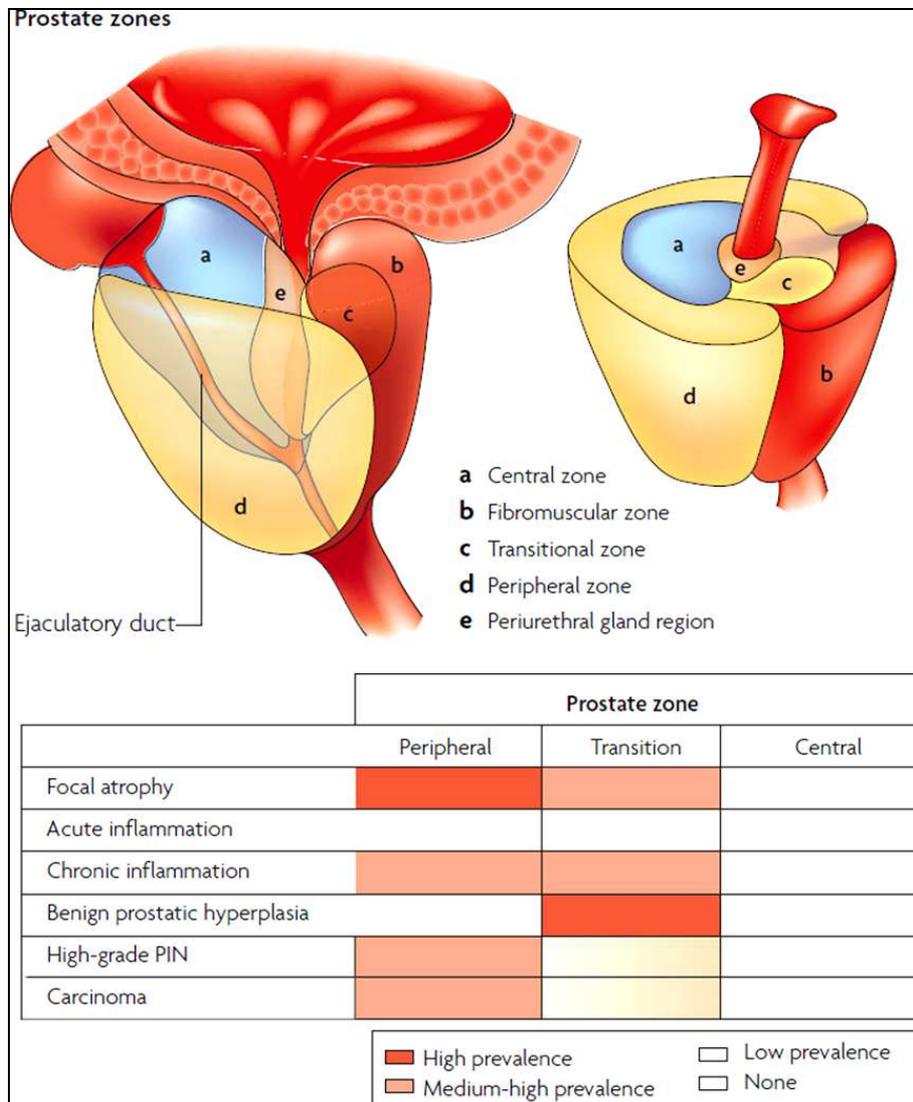
Varios autores han realizado estudios sobre las diferentes zonas estructurales de la próstata. Mc Neal¹⁰² fue uno de los primeros en proponer un modelo anatómico de la próstata describiendo cuatro zonas: transicional, central periférica y estroma fibromuscular anterior (figura 16). Posteriormente, Gil-Vernet¹⁰³ también diferenció una zona aglandular anterior de una zona glandular posterior dividida, esta última, en tres áreas concéntricas: periférica, central y transicional.

Figura 16. **Anatomía zonal de la próstata** según Mc Neal, 1988 [102]. La **zona transicional** rodea la uretra en la porción proximal a los conductos eyaculadores. La **zona central** rodea los conductos eyaculadores y se proyecta debajo de la base de la vejiga. La **zona periférica** constituye la mayor parte de las caras apical, posterior y lateral de la próstata. El **estroma fibromuscular anterior** se extiende desde el cuello vesical hasta el músculo del esfínter estriado de la uretra.



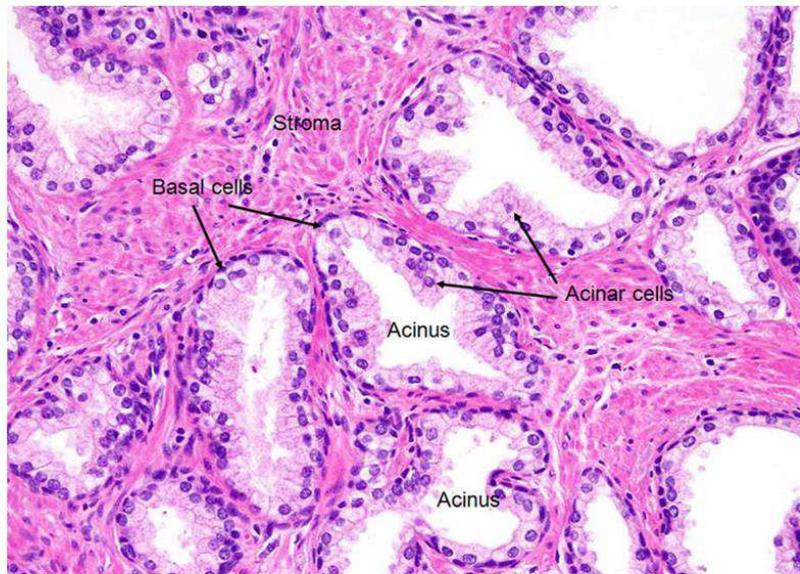
De Marzo y cols.¹⁰⁴ realizaron un excelente modelo descriptivo de la predisposición anatómica de las principales lesiones prostáticas (figura 17). Según éste, el CP se desarrolla, mayoritariamente, en la zona periférica de la glándula prostática; en menor proporción, puede hacerlo en la zona transicional y, excepcionalmente, en la zona central. La HBP suele asentar en la zona de transición, mientras que los focos de atrofia suelen hallarse en la zona periférica.

Figura 17. **Predisposición anatómica de patología prostática.** El CP suele asentar sobre la zona periférica prostática. Por contra, la hiperplasia benigna, suele desarrollarse en la zona transicional. Fuente: De Marzo y cols. 2007 [104].



La observación del tejido prostático al microscopio óptico revela un componente glandular y un componente fibromuscular o estroma, tal y como se muestra en la **figura 18**. El componente mayoritario es el glandular, formado por un epitelio cilíndrico simple de células secretoras que drenan mediante conductos excretores a la pared posterior de la uretra prostática.

Figura 18. Tinción H&E x200 aumentos de **sección histológica de próstata sin patología** subyacente. El componente glandular de la próstata está compuesto por un sistema de conductos y acinos (**acinus**). Al igual que otros órganos glandulares, las células secretoras (**acinar cells**) de la próstata se separan de la membrana basal y del estroma (**stroma**) por una capa de células basales (**basal cells**). Fuente: *Pathology for Urologists. Educational programs. E-learning. American Urology Association.*



3.1.2 Componentes del eyaculado

El semen eyaculado se compone de una fracción corpuscular (formada por espermatozoides, leucocitos, células germinales inmaduras y células epiteliales exfoliadas) y de una fracción líquida o plasma seminal producida en el testículo, el epidídimo y en las glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, próstata y glándulas de Cowper).

Las vesículas seminales aportan el 50-80% del eyaculado. Su secreción es alcalina (lo que favorece el movimiento de los espermatozoides) y es rica en fructosa, necesaria para su metabolismo. La próstata aporta entre el 15 y el 30% del líquido eyaculado, su secreción es ligeramente ácida y rica en ácido cítrico, fosfatasa ácida, proteasas, zinc, prostaglandinas, espermidina e inmunoglobulinas¹⁰⁵.

El análisis elemental del eyaculado se utiliza, principalmente, en el campo del estudio del varón infértil con el fin de descartar el factor masculino. Para ello, se emplean técnicas variadas: citológicas, bioquímicas e inmunológicas, entre otras, que analizan diferentes parámetros que pueden afectar a la capacidad potencial de fertilidad del varón. Cada laboratorio utiliza su propia técnica pero la OMS ha establecido unos valores de referencia para poder comparar resultados (Anexo I).

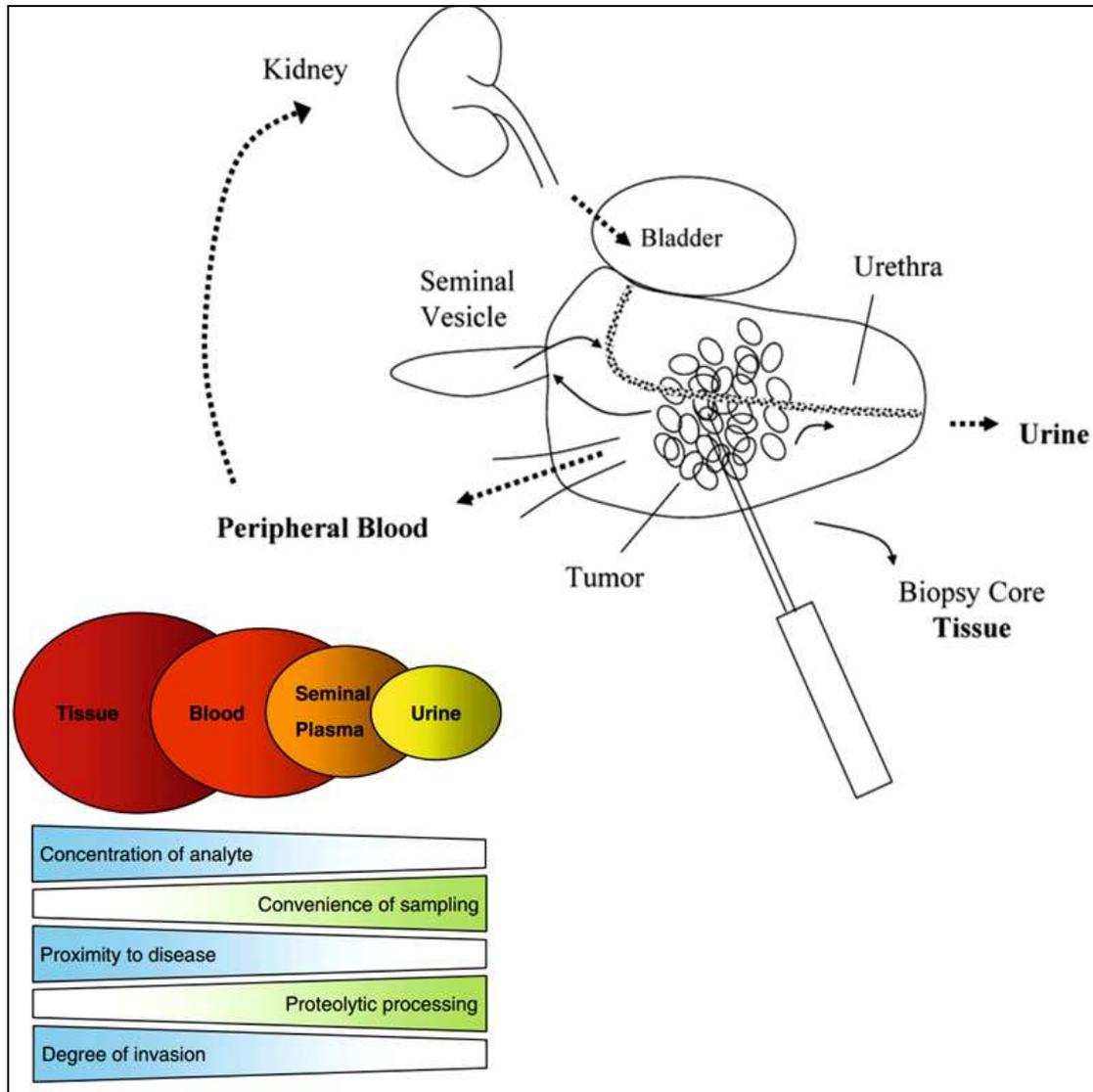
3.2 Relación líquido seminal y CP

Las muestras de tejido prostático, sangre, plasma seminal y orina, son fuentes de potenciales biomarcadores de CP.

Las muestras de tejido prostático glandular contienen, teóricamente, mayor concentración de biomarcadores, al ser más próximas al origen de la enfermedad. Su principal inconveniente es que su obtención implica una intervención invasiva con riesgos y limitaciones. El líquido seminal y la orina son fácilmente accesibles, sin embargo, se encuentran más diluidas para el análisis de biomarcadores que las de tejido y son degradadas más rápidamente por enzimas proteolíticas¹⁰⁶.

El líquido seminal combina la alta proximidad a la glándula prostática y, por tanto, a la neoplasia con la excelente accesibilidad y estabilidad, ya que, no es tan susceptible a la actividad de las enzimas proteolíticas como la orina una vez obtenida la muestra^{106,107}, constituyendo una fuente muy prometedora para potenciales biomarcadores de CP (figura 19).

Figura 19. Fuentes de biomarcadores de CP. Modificado de Schiffer, 2007 [106] y Cazares, 2010 [107].



Algunos estudios han intentado validar el uso del plasma seminal como fuente para la detección no invasiva de CP mediante el estudio proteómico. Nehaus y cols.¹⁰⁸ realizaron el análisis proteómico del eyaculado en pacientes afectados de CP, HBP, prostatitis crónica y donantes sanos mediante electroforesis capilar y espectrometría de masas. En este trabajo se pudieron definir y validar 21 péptidos presentes de manera diferencial en el plasma seminal de pacientes afectados de CP intervenido en comparación con controles.

Estos biomarcadores seminales presentaban elevada sensibilidad y especificidad (83% y 67%, respectivamente), superior a sus homólogos urinarios¹¹⁰. Una de las proteínas seminales expresadas diferencialmente fue la fosfatasa ácida prostática, cuya principal función es limitar el crecimiento de las células prostáticas. El déficit de esta proteína hallado en el plasma seminal de los pacientes con CP se asoció a la resistencia a la castración y al potencial metastásico¹⁰⁹.

3.3 Relación líquido seminal, CP y estrés oxidativo

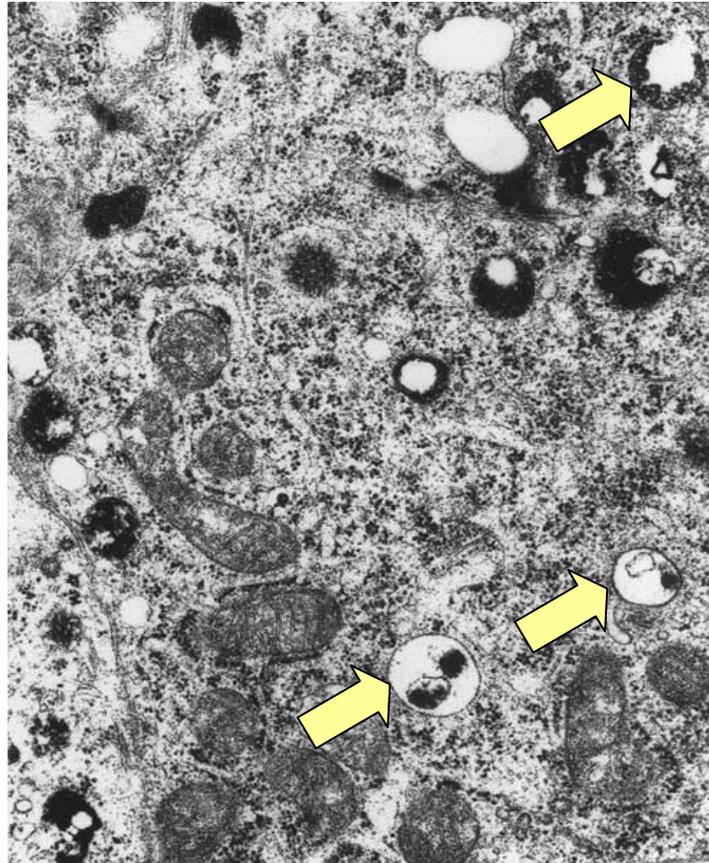
3.3.1 Fracción corpuscular del líquido seminal y estrés oxidativo

En la fracción corpuscular del semen existen dos fuentes principales de producción de ERO: leucocitos y espermatozoides. La gran mayoría de muestras de esperma contienen leucocitos, siendo los neutrófilos el tipo de celular predominante¹¹¹. Dado que la producción de ERO es uno de los principales mecanismos por los cuales los neutrófilos destruyen los agentes patógenos, los leucocitos seminales pueden constituir una potencial causa de estrés oxidativo. De hecho, la relación entre la presencia de leucocitos en el semen y la infertilidad masculina es, aún, objeto de debate¹¹².

3.3.2 Fracción plasmática del líquido seminal, estrés oxidativo y CP

La fracción líquida del semen procede, principalmente, de las vesículas seminales y de la próstata. La glándula prostática secreta unas pequeñas vesículas conocidas como prostasomas (figura 20) que contienen grandes cantidades de colesterol, calcio, proteínas, lisosomas y enzimas hidrolíticas¹¹³.

Figura 20. **Prostasomas** en el **citoplasma de una célula neoplásica prostática**. Entre los componentes citoplasmáticos, se observa un grupo de mitocondrias en la parte inferior de la figura y se señalan varios prostasomas; vesículas que contienen una cantidad variable de secreción. Microscopía electrónica (x24.000). Fuente: Ronquist G y cols. *The Janus-faced nature of prostasomes: their pluripotency favours the normal reproductive process and malignant prostate growth* [113].



Se sabe que los lisosomas y las enzimas lisosomales hidrolíticas están implicadas en los procesos que dan lugar al cáncer^{113,114}. Se conocen alrededor de 40 enzimas involucradas en las vías de hidrólisis de ácidos nucleicos, glicoproteínas y péptidos. Algunas de ellas son la enzima activadora de ubiquitina, glutamato-carboxipentidasa, lipasa, estearasa, fosfatasa ácida prostática, etc. Existe la hipótesis de que, si dichas enzimas proceden de las células secretoras de los ductos prostáticos pueden inducir sobre ellas procesos de carcinogénesis a través de su actividad hidrolítica, ya que, éstas se liberan cuando están expuestas a radiaciones ionizantes o a la peroxidación lipídica de los radicales libres¹¹⁵.

Se puede decir, por tanto, que la acción de las enzimas hidrolíticas, así como, los procesos REDOX que tienen lugar en el plasma seminal a nivel de los acinos y los ductos prostáticos podrían estar implicados en la iniciación del CP y, además, se correlacionan con la edad¹¹⁴.

3.3.3 Sistemas antioxidantes presentes en el líquido seminal

El plasma seminal y los espermatozoides están provistos de una gran variedad de mecanismos antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos¹¹⁶. Superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa componen la tríada enzimática seminal cuya misión consiste en inactivar los radicales superóxido y peróxido mediante conversión en agua y oxígeno¹¹⁷. Glutatión peroxidasa se encuentra en testículos, próstata, vesículas seminales, conductos deferentes, epidídimo, plasma seminal y espermatozoides. Los antioxidantes no enzimáticos presentes en el semen son ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), glutatión, aminoácidos (taurina, hipotaurina), albúmina, carnitina, carotenoides, flavonoides, urato y prostasomas. Estos agentes actúan mediante neutralización directa de la actividad de los radicales libres.

3.3.4 Determinación del estrés oxidativo en muestras de líquido seminal

Una de las principales razones por las que la detección del estrés oxidativo no es una técnica de rutina en los laboratorios de Andrología es el coste y la complejidad de las pruebas y la necesidad de una estandarización de sus valores normales^{118,119}. A continuación, se presentan diferentes métodos para determinar las ERO presentes en una muestra de plasma seminal.

3.3.4.1 Métodos directos

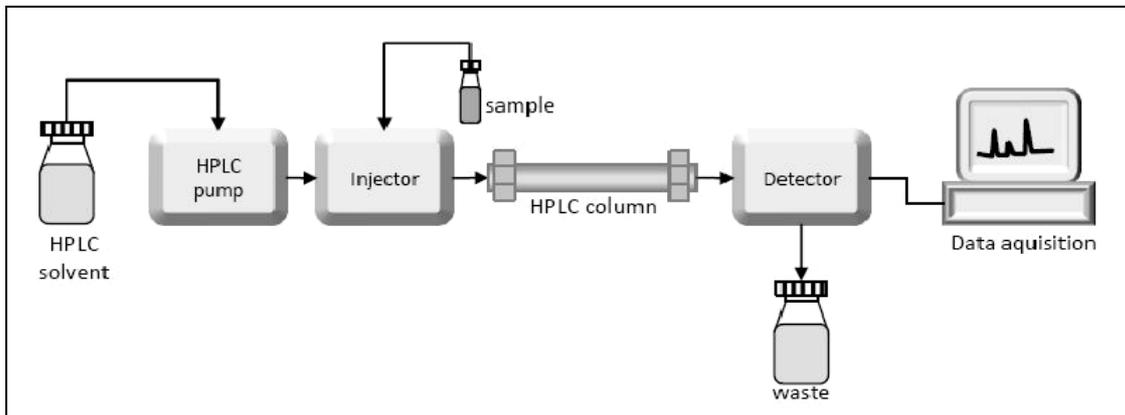
Estos ensayos cuantifican el daño creado por el exceso de radicales libres contra la membrana lipídica del espermatozoide o su ADN. Dado que el estrés oxidativo es el resultado de un equilibrio entre la producción de ERO y el total de capacidad antioxidante, las pruebas directas reflejan el efecto biológico neto entre estas dos fuerzas opuestas.

Niveles de malonildialdehído (MDA)

El método más ampliamente utilizado para evaluar la oxidación de la membrana espermática es la medición de los niveles de malonildialdehído (MDA), un producto de la oxidación lipídica procedente del espermatozoide o del plasma seminal. Los niveles de MDA en los espermatozoides son muy bajos y, por tanto, requieren el uso de un equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC)¹²⁰ cuyo esquema se representa en la **figura 21** o el uso de espectrocitometría de flujo. Los niveles de MDA en plasma seminal son de cinco a diez veces mayores que en los espermatozoides, por lo que es posible su medición en espectrofotómetros estándar¹²¹.

La determinación del MDA parece tener relevancia clínica, ya que, su concentración en plasma seminal y en los espermatozoides es elevada en hombres infértiles con exceso de producción de ERO en comparación con los controles fértiles¹²¹.

Figura 21. Diagrama esquemático de un **equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC)**. Fuente: Czaplicki S. *Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. Electrical and Electronic Engineering "Column Chromatography"*. Chapter 4. 2013 [120].



Medición de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG)

La mejor evaluación directa del daño oxidativo del ADN espermático es la medición de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), principal marcador de la oxidación del ADN. Éste se puede medir en el espermatozoide o en el plasma seminal mediante equipos de HPLC o directamente dentro del espermatozoide usando inmunofluorescencia¹²².

3.3.4.2 Métodos indirectos

Ensayos de quimioluminiscencia

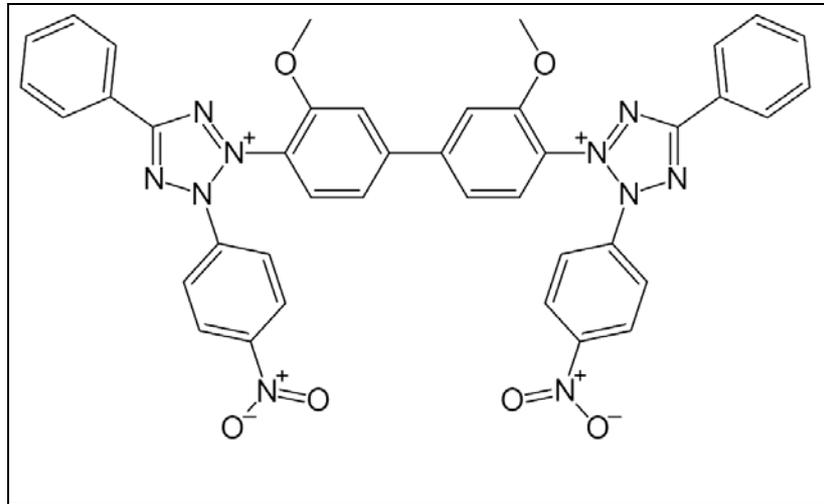
Los ensayos de quimioluminiscencia utilizando luminol o lucigenina son las técnicas más comúnmente descritas para detectar la producción de ERO en el líquido seminal. Estas sondas son muy sensibles y tienen la ventaja de disponer de rangos relativamente bien establecidos publicados tanto para la población fértil como infértil¹¹⁸. No obstante, dicha determinación se ha visto obstaculizada por un equipo costoso y por dificultades en el control de calidad debidas a factores de confusión de ensayo, tales como, el tiempo de incubación y la contaminación por leucocitos y plasma seminal¹¹⁹. Además, se ha demostrado que la lucigenina cuando se somete a auto-oxidación conduce a la producción de aniones superóxido¹²³, por tanto, se puede decir que, las sondas quimioluminiscentes no constituyen el reactivo ideal para la medición de anión superóxido en el espermatozoide.

Test de nitroazul tetrazolio (NBT)

La cuantificación lumínica de la actividad nitroazul tetrazolio (NBT) mediante espectrofotometría o microscopía de luz es uno de los métodos de determinación de ERO más sencillos.

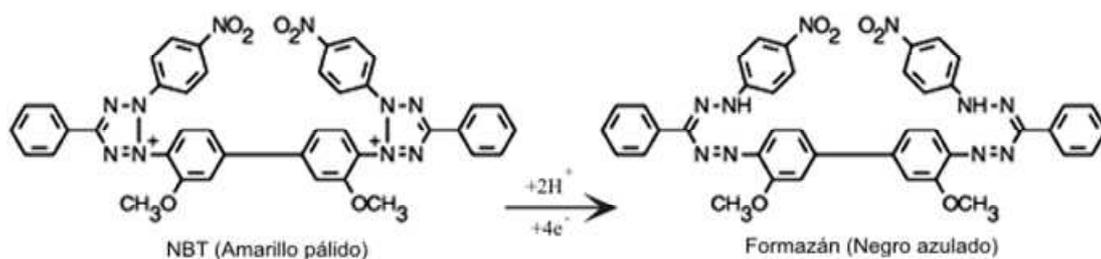
El nitroazul de tetrazolio o NBT del inglés *Nitro blue tetrazolium* es un compuesto químico formado por la unión de dos grupos tetrazol¹²⁴, como se representa en la **figura 22**.

Figura 22. Fórmula molecular de **nitroazul de tetrazolio**. Fuente: Trinh y cols. 2007 [124]



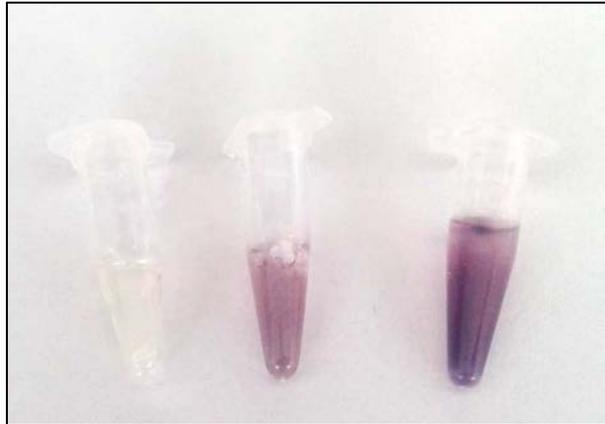
El NBT es comúnmente utilizado como indicador REDOX; en las reacciones en las que participa normalmente acepta cuatro electrones y dos protones (figura 23) para pasar a su forma reducida insoluble, el formazán, que es de color azul púrpura.

Figura 23. Representación química de la **reducción del compuesto NBT**, dando lugar a su forma insoluble, los cristales de formazán. Fuente: Trinh y cols. 2007 [124]



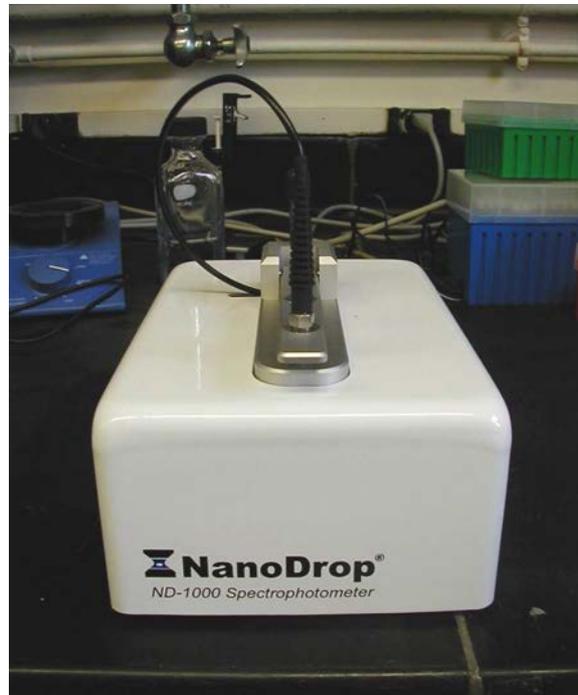
El NBT reacciona con las ERO presentes en el líquido seminal dando lugar a la producción de cristales insolubles de formazán^{125,126}, como se observa en la figura 24.

Figura 24. La **acción de las ERO** en diferentes muestras de **plasma seminal** da lugar a cristales insolubles de **formazán de color azul púrpura**. Cortesía del Dr. Agustín García Peiró. UDIAT Centro Diagnóstico. Parc Taulí Sabadell. Hospital Universitario.



Dado que la producción de cristales de formazán mediante el test NBT en una muestra de líquido seminal se correlaciona con la producción de ERO en dicha muestra, la medida de la absorbancia del formazán puede utilizarse para cuantificar los niveles de estrés oxidativo¹²⁵⁻¹²⁹. Esto se realiza mediante espectrofotometría (figura 25).

Figura 25. **Espectrofotómetro.** La medición de la **absorbancia del formazán** mediante espectrofotometría permite cuantificar el estatus oxidativo de una muestra. Cortesía del Dr. Agustín García Peiró. UDIAT Centro Diagnóstico. Parc Taulí Sabadell. Hospital Universitario.



Los primeros protocolos de ensayo NBT para la determinación de la absorbancia de una solución de formazán utilizaban longitudes de onda desde 240 nm a 1.100 nm¹³⁰ utilizando un espectrofotómetro continuo. Dado que el pico de absorbancia en los ensayos de Tunc¹³¹ ocurría entre los 530 y los 740 nm, se decidió establecer como estándar de mediciones los 530 nm, ya que, es un filtro común de longitud de onda disponible para la mayoría de lectores de placa de ELISA, lo cual, es útil para la comparación de las muestras con los estándares habituales.

El grupo de Tunc¹³¹ fue pionero en el uso de esta técnica en muestras de semen para relacionar el estrés oxidativo con la calidad espermática en poblaciones infértiles.

Se ha demostrado que el ensayo NBT se correlaciona bien con las técnicas tradicionales de quimioluminiscencia¹³² y, además, tiene dos ventajas adicionales. En primer lugar, es un test económico, ya que, sólo requiere un espectrofotómetro como instrumento de medición. En segundo lugar, puede discriminar entre la producción de ERO por espermatozoides y leucocitos sin el uso de otras técnicas adicionales, a diferencia de los ensayos de quimioluminiscencia. El principal inconveniente que obstaculiza su uso generalizado en los laboratorios clínicos de Andrología para el diagnóstico del varón infértil es la ausencia de rangos de referencia o rangos de normalidad publicados y consensuados¹³¹.

Por otro lado, no se ha hallado ningún estudio donde el ensayo NBT se utilizara en procesos diagnósticos de CP u otros procesos no relacionados con el ámbito del varón infértil.

Justificación

JUSTIFICACIÓN

La elevada incidencia del CP hace necesaria la optimización de las pruebas que conducen a su diagnóstico, especialmente en pacientes jóvenes y en varones con neoplasia de alto riesgo de recidiva y/o progresión.

En la actualidad, la biopsia prostática es el método más fiable para el diagnóstico del CP, no obstante, su indicación se basa en los niveles de PSA plasmático y el tacto rectal, parámetros de limitada sensibilidad y especificidad. La biopsia de próstata es, además, una prueba invasiva y con un riesgo significativo de infradiagnóstico e infraestadificación, dada la multifocalidad del CP.

Se han descrito numerosos biomarcadores diagnósticos y pronósticos de CP que permiten aumentar la sensibilidad y especificidad de las pruebas actuales, sin embargo, todos ellos requieren complejas y costosas técnicas de análisis que dificultan su uso generalizado.

Basándose en la conocida relación entre el estrés oxidativo cuantificado a través de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el CP, con este trabajo se pretende valorar un nuevo método no invasivo, económico y fácilmente aplicable en la práctica clínica que permita diferenciar varones con CP respecto a varones sanos, una vez establecida la sospecha clínica y analítica.

Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

Los niveles de estrés oxidativo o niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en plasma seminal podrían estar aumentados en sujetos con CP respecto a los sujetos sin CP en la biopsia transrectal ecoguiada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Conocer si existe relación entre los niveles de estrés oxidativo en plasma seminal y la presencia de CP en la biopsia prostática.

2.2 Objetivos secundarios

1. Analizar la utilidad de los niveles de estrés oxidativo en plasma seminal como marcador pronóstico de CP, mediante la relación entre los niveles de ERO y la fracción de cilindros afectados, así como, la relación entre los niveles de ERO y el grado de Gleason en la biopsia prostática.
2. Analizar la relación del estrés oxidativo en plasma seminal con otras variables relevantes en el varón con sospecha de CP como son la edad, el tacto rectal y el volumen prostático.

Material y métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio observacional prospectivo de casos de varones con sospecha de cáncer de próstata en base a valores de PSA alterado y/o tacto rectal sospechoso.

2. ÁMBITO DEL ESTUDIO

El reclutamiento de los pacientes se llevó a cabo por todos los miembros del Servicio de Urología del Parc Taulí de Sabadell, Hospital Universitario.

El Hospital Universitario Parc Taulí de Sabadell, inaugurado en el año 1986, dispone de un total de 682 camas, contabiliza 32.000 ingresos anuales y consta de una área sanitaria de referencia de 392.388 habitantes, según datos de 2017.

En 2015, en el Servicio de Urología se realizaron un total de 770 intervenciones de ámbito convencional (cirugía mayor), 1.061 intervenciones de ámbito ambulatorio (cirugía menor ambulatoria) y un total de 17.835 visitas (6.212 primeras visitas y 17.835 visitas sucesivas en la consulta externa del gabinete urológico).

El análisis del plasma seminal se ha llevado a cabo en el laboratorio de análisis clínicos UDIAT del Hospital Universitario Parc Tauli, en el cual, se centralizan todos los servicios diagnósticos integrados con el proceso asistencial.

3. PERIODO DE ESTUDIO

Se elaboró un protocolo de desarrollo del estudio en el último semestre de 2013, con una previsión de duración del trabajo de campo de 18 meses.

El trabajo de campo (reclutamiento de los pacientes) se realizó en el periodo estimado, entre Enero de 2014 y Julio de 2015, ambos inclusive.

4. SUBVENCIONES DEL ESTUDIO

El proyecto fue subvencionado mediante la obtención de la Beca CIR 2012 (código CIR2012/029) de Investigación e Innovación de la Fundación Parc Taulí en su 14ª convocatoria (Anexo II).

El protocolo de desarrollo del estudio y el modelo de Hoja de Consentimiento Informado fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Corporación Sanitaria Parc Taulí de Sabadell (Referencia núm.: 2013533) con fecha 26 de marzo de 2013 (Anexo II).

5. POBLACIÓN A ESTUDIO

5.1 Criterios de inclusión

Varones derivados a la consulta externa de Urología por sospecha clínico - analítica de CP según los siguientes criterios:

- PSA plasmático total ≥ 10 ng/ml.
- PSA plasmático total 4-10 ng/ml con fracción PSA libre / PSA total ≤ 20 %.

y/o:

- Tacto rectal sospechoso de neoplasia.

5.2 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión del estudio fueron los siguientes:

- Edad superior a 75 años.
- Antecedente de biopsia prostática previa.
- Varones con aneyaculación (imposibilidad de eyacular o producción de líquido seminal en un volumen inferior a 1,5 ml).
- Infección de orina o prostatitis concomitante o reciente.
- Manipulación reciente de la vía urinaria.
- Entrega de la muestra más allá del plazo de una hora tras su obtención.
- Incumplimiento de los periodos de eyaculación previa y abstinencia sexual establecidos.

6. VARIABLES DEL ESTUDIO

6.1 Variables principales

- Niveles de estrés oxidativo o de especies reactivas de oxígeno (ERO) en plasma seminal determinados mediante ensayo NBT.
- Presencia de células neoplásicas en la biopsia prostática (subgrupo sujetos con biopsia positiva / subgrupo sujetos con biopsia negativa).

6.2 Variables secundarias

- Fracción de cilindros afectados por neoplasia ($\leq 50\%$ cilindros / $> 50\%$ cilindros)
- Grado histológico de Gleason en la biopsia (6-10)
- Edad al diagnóstico (años)
- PSA total (ng/ml)
- Fracción PSA libre / PSA total (%)
- Volumen prostático (ml)

7. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

Este estudio se ha dimensionado para identificar un aumento medio de los niveles de ERO en el subgrupo de sujetos "biopsia positiva" de 0,030 unidades, asumiendo que, en el subgrupo "biopsia negativa", el nivel medio de ERO es de 0,040 (desviación estándar de 0,030).

Para detectar esta diferencia y asumiendo unos errores tipo I y tipo II del 5% y del 10% respectivamente, era necesario incluir un total de 43 sujetos.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cualitativas se presentan como porcentajes y las cuantitativas como media, mediana y desviación estándar o rango (mínimo – máximo).

Se utilizó la prueba de *Shapiro-Wilk* para detectar la normalidad de la distribución de las variables cuantitativas.

La significación estadística para la detección de las diferencias entre los diversos subgrupos de sujetos a estudio se evaluó mediante las pruebas *t de Student* o *U de Mann-Whitney*, según fuera la variable a contrastar Normal o no Normal, respectivamente.

En el caso de comparar tres subgrupos de sujetos, se utilizó la prueba no paramétrica de *Kruskal-Wallis* seguida de la comparación múltiple por pares por el *método de Dunn*, en caso de significación estadística.

La asociación entre los niveles de ERO y el grado de Gleason de la biopsia prostática se estudió mediante regresión lineal simple.

En todas las pruebas la significación estadística se estableció en p-valores < 0,05.

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico IBM® SPSS® Statistics for Windows, Version 21.0 (Armonk, NY: IBM Corp).

9. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

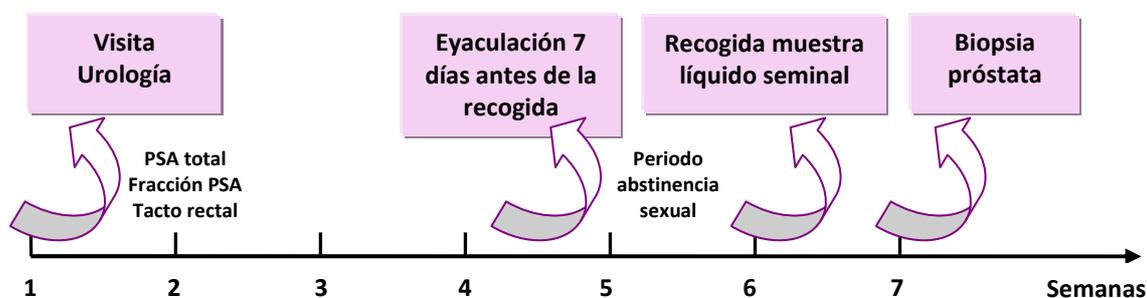
9.1 Historia asistencial

Los varones que cumplían los criterios de inclusión fueron informados sobre las características y el objetivo del estudio. Tras confirmar su participación, los voluntarios cumplimentaron y firmaron la hoja de Consentimiento Informado (Anexo III), creada según el protocolo de desarrollo del estudio. La confidencialidad de la información personal de cada sujeto se realizó mediante el uso de números de identificación anonimizados.

En la consulta de Urología se definieron dos tipos de consistencia de la glándula prostática para describir el tacto rectal: tacto rectal "no sospechoso" de neoplasia y tacto rectal "sospechoso" de neoplasia. Se confirmó la elevación de la cifra de PSA total y fracción de PSA libre / PSA total mediante una nueva determinación, en caso de disponerse de una única medición.

En la [figura 26](#) se muestra el cronograma de los procedimientos y toma de muestras del estudio descritos a continuación.

Figura 26. **Cronograma** de procedimientos y toma de muestras del estudio.



9.2 Toma de muestras de líquido seminal

Entre las 4-5 semanas tras la visita en la consulta de Urología, los pacientes realizaron la entrega de la muestra de líquido seminal al laboratorio. Dicha entrega debía realizarse en el plazo de una hora tras su obtención mediante masturbación. Se requirió haber eyaculado una semana antes de la recogida de la muestra y no eyacular nuevamente hasta recoger la muestra.

La muestra debía almacenarse en un recipiente de plástico estéril rotulado con el número de identificación anonimizado que le fué proporcionado a cada varón el día de la primera consulta urológica. Cada paciente debía indicar en el recipiente la fecha y hora de recogida de la muestra y los días de abstinencia sexual.

9.3 Cuantificación del estrés oxidativo en plasma seminal

Las muestras de líquido seminal fueron centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos para separar por completo la fracción plasmática de la fracción corpuscular. Para el análisis del estrés oxidativo se tomó, exclusivamente, la fracción plasmática del líquido seminal.

La cuantificación del estrés oxidativo o niveles de ERO en plasma seminal se realizó mediante el test de nitroazul tetrazolio o ensayo NBT descrito según Baehner¹²⁵, que consiste en la incubación de 100 µlitros de plasma seminal a igual volumen de reactivo NBT (diluido con PBS a 1:10 y obtenido de stock de NBT al 0,01%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 37° C durante 45 minutos.

Tras la incubación, las muestras fueron bañadas y centrifugadas dos veces a 500 rpm durante 10 minutos con PBS para eliminar el exceso de solución NBT residual.

La producción de ERO de cada muestra se determinó mediante el cálculo de la absorbancia de la reacción colorimétrica resultante de la formación de cristales de formazán utilizando espectrofotometría en un lector de micropletina a 530 nm.

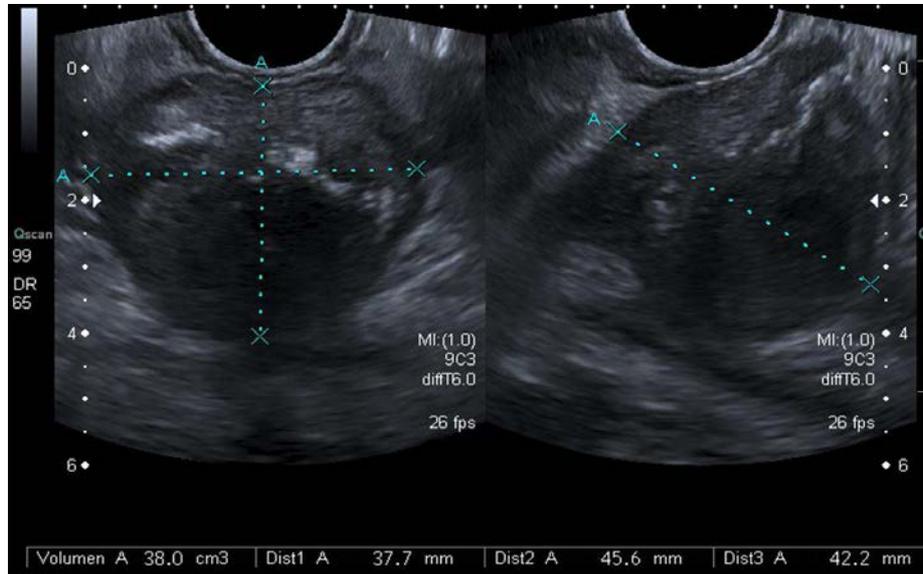
9.4 Obtención de biopsias prostáticas

Posteriormente, se llevaron a cabo las biopsias prostáticas, a cargo del servicio de Diagnóstico por la Imagen, tal y como se indica en el cronograma de procedimientos y toma de muestras del estudio (figura 26).

La técnica se realizó mediante sonda ecográfica transrectal (Toshiba Aplio 500. Compañía: Ultrasound Expertise and Solutions. San Jose, California 95112, USA) y aguja automática 18 G tras infiltración de 5 ml de anestésico local (lidocaína al 2%) a cada lado de la zona peri-prostática. Previa toma de biopsias, se realizó una medición ecográfica transrectal del volumen prostático a través de la fórmula del elipsoide (volumen = $0,52 \times \text{diámetro máx. antero-posterior} \times \text{diámetro máx. transversal} \times \text{diámetro máx. céfalo-caudal}$)¹³³.

En la figura 27 se muestra la metodología de medición del volumen prostático mediante ecografía transrectal de uno de los varones del estudio.

Figura 27. **Ecografía prostática transrectal**; proyección transversal y sagital para estimación del volumen prostático previa toma de biopsias. Cortesía Dr. Malet. Servicio de Diagnóstico por la Imagen. UDIAT. Corporación Sanitaria Parc Taulí, Sabadell.



Las biopsias prostáticas se realizaron tomando cinco cilindros de tejido de la zona periférica de cada lóbulo prostático; izquierdo y derecho (un cilindro de la porción medial a la base y los otros cuatro laterales distribuidos de manera homogénea entre la base y el ápex prostático). Se obtuvieron un total de 10 cilindros de tejido, según las recomendaciones de Guía de Cáncer de Próstata de la EAU (2014)³³. Posteriormente, los cilindros se remitieron por separado en formol para su estudio histológico.

9.5 Procesamiento y análisis histopatológico de las biopsias prostáticas

Las muestras se fijaron en formol al 10% y se remitieron al Servicio de Patología donde se incluyeron en parafina.

Se practicaron seis niveles de corte de cada muestra de material parafinado de cinco micras de espesor que se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E). También se prepararon sistemáticamente, de dos a tres cortes blancos intermedios, para una posible inmunotinción adicional. En las figuras 28a y 28b, se muestran dos cortes histológicos de dos biopsias de varones del estudio.

Figura 28a. **Adenocarcinoma de próstata grado de Gleason 3.** Tinción H&E. x200 aumentos. Cortesía Dra. Costa. Servicio de Patología. Parc Taulí Sabadell. Hospital Universitario.

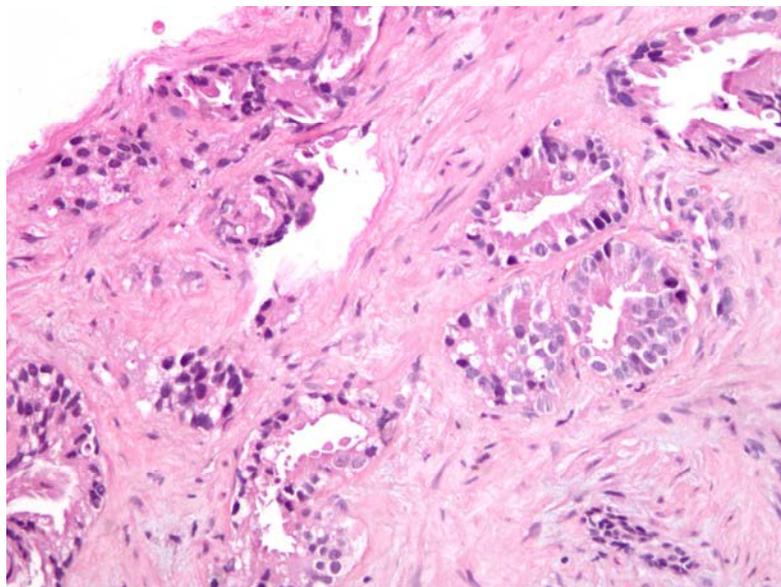
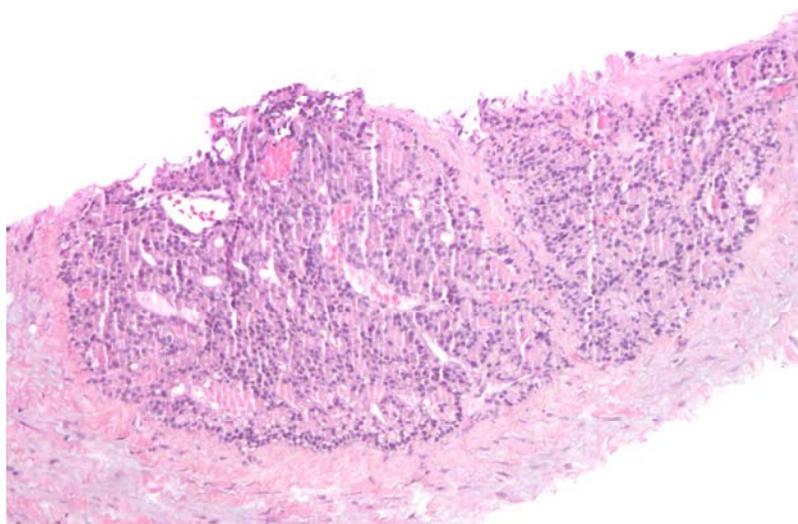


Figura 28b. **Adenocarcinoma de próstata grado de Gleason 4.** Tinción H&E. x100 aumentos. Cortesía Dra. Costa. Servicio de Patología. Parc Taulí Sabadell. Hospital Universitario.



A continuación, un mismo patólogo, analizó los siguientes parámetros histológicos de cada muestra:

1. Determinación de la presencia o ausencia de neoplasia prostática.
2. Cuantificación de la fracción de cilindros afectados o invadidos por neoplasia en cada lóbulo prostático.
3. Gradación de la neoplasia, de acuerdo al sistema de Gleason, siguiendo las normas acordadas en la Conferencia de Consenso sobre el grado de Gleason del carcinoma de próstata de la ISUP, 2005 ⁴⁵.
4. Adicionalmente, también se evaluó la presencia o ausencia de otros hallazgos histopatológicos en la biopsia, tales como la lesión preneoplásica ASAP, así como, parámetros de inflamación crónica leve, moderada o marcada.

Resultados

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

Se reclutaron un total de 45 varones que cumplían los criterios de inclusión (N = 45).

En la [tabla 14](#) se presentan los valores individuales de todas las variables recogidas en el estudio.

Los valores de la fracción de PSA libre / PSA total cuando el PSA total fue igual o mayor a 10 ng/ml no se cuantificaron en el laboratorio, ya que, carecen de utilidad clínica para la indicación de biopsia prostática²⁴.

Tabla 14. Parámetros clínicos, analíticos, ecográficos e histopatológicos analizados en los sujetos del estudio (N = 45).

Edad (años)	PSA (ng/ml)	Fración PSA (%)	Tacto rectal	Volumen prostático (ml)	Biopsia próstata (der.)	Grado Gleason (der.)	Biopsia próstata (izq.)	Grado Gleason (izq.)	Fración de cilindros afectados > 50%	Nivel ERO (A ₃₃₀ nm)
55	4	7	Normal	37	Adenocarcinoma	7	No neoplasia	-	No	0,1100
54	5	25	Normal	12	No neoplasia	-	Adenocarcinoma	6	No	0,0300
66	6	18	Normal	51	Adenocarcinoma	6	Adenocarcinoma	6	Si	0,0350
60	10	-	Normal	60	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0425
65	6	14	Normal	49	Adenocarcinoma	7	Adenocarcinoma	7	Si	0,0570
56	9	24	Normal	57	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,1880
51	5	18	Normal	41	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0570
66	7	13	Normal	38	Adenocarcinoma	6	Adenocarcinoma	7	Si	0,0450
59	7	17	Normal	26	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0260
70	6	15	Normal	40	Adenocarcinoma	6	Adenocarcinoma	6	Si	0,0320
69	5	7	Sospechoso	27	Adenocarcinoma	7	Adenocarcinoma	9	Si	0,1000
65	5	11	Normal	35	No neoplasia	-	Adenocarcinoma	7	No	0,0180
63	7	29	Normal	25	Adenocarcinoma	6	Adenocarcinoma	6	Si	0,0700
46	9	16	Normal	32	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0400
62	8	15	Normal	46	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0240
59	5	15	Normal	48	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0220
68	8	10	Normal	14	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0380
60	4	13	Normal	13	No neoplasia	-	Adenocarcinoma	6	No	0,0370
56	5	12	Normal	49	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0405
71	6	18	Normal	20	Adenocarcinoma	7	No neoplasia	-	No	0,0125
53	6	19	Normal	19	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0470
56	5	23	Normal	31	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0555

Edad (años)	PSA (ng/ml)	Fracción PSA (%)	Tacto rectal	Volumen prostático (ml)	Biopsia próstata (der.)	Grado Gleason (der.)	Biopsia próstata (izq.)	Grado Gleason (izq.)	Fración de cilindros afectados > 50%	Nivel ERO (*A ₅₃₀ nm)
64	5	23	Normal	35	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0550
53	5	17	Normal	27	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0420
63	8	12	Normal	53	Adenocarcinoma	6	Adenocarcinoma	6	Si	0,0110
72	11	-	Normal	52	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0200
66	5	12	Normal	28	Adenocarcinoma	6	No neoplasia	-	No	0,0350
69	4	8	Normal	18	Adenocarcinoma	6	Adenocarcinoma	6	Si	0,0515
67	6	14	Normal	24	Adenocarcinoma	6	No neoplasia	-	No	0,1345
56	4	23	Normal	77	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0200
68	7	20	Normal	21	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0355
58	15	-	Normal	25	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0200
58	10	-	Sospechoso	12	Adenocarcinoma	7	Adenocarcinoma	8	Si	0,0360
45	18	-	Normal	22	No neoplasia	-	Adenocarcinoma	7	No	0,0595
50	10	-	Normal	69	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0530
67	6	17	Normal	48	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0370
71	10	-	Sospechoso	30	Adenocarcinoma	9	Adenocarcinoma	7	Si	0,0385
63	16	-	Sospechoso	44	Adenocarcinoma	7	Adenocarcinoma	7	Si	0,0590
58	5	9	Normal	36	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0130
55	7	16	Normal	53	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0790
75	7	12	Normal	34	Adenocarcinoma	6	Adenocarcinoma	6	Si	0,0170
70	20	-	Normal	101	No neoplasia	-	Adenocarcinoma	6	No	0,0080
54	10	-	Normal	43	No neoplasia	-	Adenocarcinoma	6	No	0,0130
62	5	13	Sospechoso	52	Adenocarcinoma	7	Adenocarcinoma	7	Si	0,1260
69	7	9	Normal	45	No neoplasia	-	No neoplasia	-	-	0,0230

*A₅₃₀ = Absorbancia a 530 nm

En la [tabla 15](#) se presentan los valores de los estadísticos descriptivos de las variables cuantitativas del estudio: edad, PSA total, volumen prostático y nivel de ERO. Asimismo, en la [tabla 16](#) se muestran los valores absolutos y relativos de las variables cualitativas: sujetos con tacto rectal sospechoso, sujetos con biopsia positiva para neoplasia, sujetos con > 50% cilindros afectados por neoplasia y sujetos con los diferentes grados de Gleason en la biopsia. Para determinar el valor del grado Gleason de las biopsias prostáticas, en caso de afectación neoplásica bilateral (ambos lóbulos prostáticos afectados), se tomó el valor del mayor grado de Gleason.

Tabla 15. Estadísticos descriptivos de las **variables cuantitativas** del estudio (n= 45).

Variables cuantitativas	Media	Mediana	DE*	Mínimo	Máximo
Edad (años)	61,4	62	7,231	45	75
PSA total (ng/ml)	7,53	6	3,647	4	20
Volumen prostático (ml)	37,93	36	18,522	12	101
Nivel de ERO (A_{530 nm} **)	0,047	0,038	0,036	0,008	0,188

*DE = Desviación estándar; **A = Absorbancia a 530 nm

Tabla 16. Valores absolutos y relativos de las **variables cualitativas** del estudio (n=45).

Variables cualitativas	Valor absoluto (n)	Valor relativo (%)
Tacto rectal sospechoso	5	11,1
Biopsia positiva para neoplasia	23	51,2
Afectación neoplásica > 50% cilindros	13	28,8
Biopsia Gleason 6	11	24,4
Biopsia Gleason 7	9	20,0
Biopsia Gleason 8	1	2,2
Biopsia Gleason 9	2	4,4
Biopsia Gleason 10	0	0

Se realizó la prueba de *Shapiro-Wilk* para detectar la normalidad de la distribución de las variables cuantitativas continuas del estudio (tabla 17). Todas las variables, excepto la edad, presentaban una distribución no normal, por lo que, en los análisis estadísticos se emplearon tanto pruebas paramétricas como no paramétricas.

Tabla 17. Prueba de *Shapiro-Wilk* para contrastar la normalidad de la distribución de las variables cuantitativas (n = 45).

Variables	Estadístico	Grados de libertad	p-valor
Edad	0,974	45	0,391
PSA total	0,781	45	< 0,001
Volumen prostático	0,935	45	0,014
Nivel de ERO	0,795	45	< 0,001

2. ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA SEMINAL Y DIAGNÓSTICO DE CP. OBJETIVO PRINCIPAL.

2.1 Estrés oxidativo en plasma seminal y biopsia prostática

Se hallaron 22 de los 45 varones con biopsia negativa y 23 con biopsia positiva para células neoplásicas (48,8% y 51,2%, respectivamente).

En todas las biopsias positivas se halló, como tipo histológico, el adenocarcinoma acinar. Las biopsias negativas, en cambio, fueron descritas mediante diferentes terminologías diagnósticas: "*hiperplasia adenomatosa sin evidencia de malignidad*", "*negativo en cuanto a neoplasia maligna*" y "*Atypical small acinar proliferation (ASAP)*".

En la [tabla 18](#) se presentan las diferentes descripciones histopatológicas de los varones con biopsia negativa y la mediana de ERO correspondiente. Como se observa, los niveles de ERO en varones con ASAP en la biopsia no diferían de niveles de ERO en varones sin dicha lesión preneoplásica.

Tabla 18. Niveles de ERO de varones con **biopsia negativa**, según la presencia o no de ASAP. Prueba de U de Mann-Whitney (n=22).

	N	Descripción histopatológica	Mediana ERO	Rango promedio ERO	p-valor
Varones con biopsia negativa (n=22)	14	Hiperplasia adenomatosa sin evidencia de malignidad	0,040	11,23	0,554
	6	Negativo en cuanto a neoplasia maligna			
	2	<i>Atypical small acinar proliferation (ASAP)</i>	0,046	14,25	

Para el análisis de los niveles de estrés oxidativo o niveles de ERO en plasma seminal, principal variable del estudio, se dividió la muestra total de varones en dos subgrupos, según el resultado de la biopsia prostática:

- Subgrupo de varones con biopsia negativa (ausencia de células neoplásicas en el análisis histológico de ambos lóbulos prostáticos).
- Subgrupo de varones con biopsia positiva (evidencia de células prostáticas en uno o en ambos lóbulos prostáticos).

En la [tabla 19](#) se muestra la estadística descriptiva de los niveles de ERO en cada uno de los subgrupos definidos.

Tabla 19. **Estadística descriptiva** de los **niveles de ERO** por subgrupos de sujetos: subgrupo de biopsia negativa y subgrupo de biopsia positiva.

BIOPSIA	N	Mediana ERO	Mínimo ERO	Máximo ERO
Negativa	22	0,039	0,013	0,188
Positiva	23	0,037	0,008	0,134

Se realizó un estudio comparativo, mediante la prueba *U* de *Mann-Whitney*, entre los dos subgrupos en cuanto a niveles de ERO en plasma seminal.

Como se muestra en la [tabla 20](#), el análisis estadístico no reveló diferencias significativas en cuanto a los niveles de ERO en plasma seminal entre los varones con biopsia positiva y los varones con biopsia negativa ($p = 0,901$).

Tabla 20. Análisis comparativo de los **niveles de ERO** por subgrupos de sujetos en función del diagnóstico de cáncer en la **biopsia prostática**. Prueba de *U* de *Mann-Whitney* (n=45).

BIOPSIA	N	Mediana ERO	Rango promedio ERO	p-valor
Negativa	22	0,039	22,75	0,901
Positiva	23	0,037	23,24	

Adicionalmente, se analizó la presencia o ausencia de parámetros de inflamación crónica (discreta, moderada o marcada) en las biopsias prostáticas de ambos subgrupos. No se evidenciaron focos de prostatitis moderada ni marcada en las muestras del estudio, siendo predominante la ausencia de dichos parámetros, seguida de la presencia de inflamación leve o discreta de manera muy aislada y distribuida homogéneamente entre ambos subgrupos.

2.2 Biopsia prostática y otras variables descriptivas: edad, PSA y volumen prostático

En la [tabla 21](#) se muestran los valores de la media y la desviación estándar de la variable "edad" y los valores de la mediana, mínimo y máximo de las variables "PSA total" y "volumen prostático" por subgrupos de sujetos en función del resultado de la biopsia prostática (positiva o negativa para neoplasia).

Tabla 21. Estadísticos descriptivos de la **edad**, niveles de **PSA total**, **volumen prostático** y niveles de **ERO** según el resultado de la **biopsia prostática**.

Variables	Biopsia negativa (n = 22)	Biopsia positiva (n = 23)
Edad (años)		
Media	58,9	63,8
DE*	6,80	6,95
PSA total (ng/ml)		
Mediana	7	6
Mínimo	4	4
Máximo	15	20
Volumen próstata (ml)		
Mediana	43	34
Mínimo	14	12
Máximo	77	101

*DE = desviación estándar

Se realizó un análisis comparativo entre el subgrupo de sujetos con biopsia positiva y el subgrupo con biopsia negativa en cuanto a la edad, el PSA total y el volumen prostático.

En cuanto a la edad, el estudio comparativo mediante la prueba *t de Student* reveló que el subgrupo de varones con biopsia positiva fue, en promedio, 4,9 años mayor que el subgrupo con biopsia negativa ($p = 0,022$) (tabla 22). En cambio, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos subgrupos respecto a los valores de PSA total ($p = 0,818$) y respecto al volumen prostático ($p = 0,128$) (tabla 23).

Tabla 22. Análisis comparativo de la variable **edad** en función del resultado de la **biopsia prostática**. Prueba *t de Student* (n =45).

	BIOPSIA	N	Media	Desviación estándar	p-valor
Edad (años)	Negativa	22	58,909	6,795	0,022
	Positiva	23	63,782	6,954	

Tabla 23. Análisis comparativo del **PSA total** y del **volumen prostático** en función del resultado de la **biopsia prostática**. Prueba *U de Mann-Whitney* (n =45).

	BIOPSIA	N	Mediana	Rango promedio ERO	p-valor
PSA total (ng/ml)	Negativa	22	7	23,45	0,818
	Positiva	23	6	22,57	
Volumen prostático (ml)	Negativa	22	43	26,05	0,128
	Positiva	23	34	20,09	

3. ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA SEMINAL COMO MARCADOR PRONÓSTICO DE CP.

Se tomó al subgrupo de sujetos con biopsia positiva para el estudio comparativo entre los niveles de ERO y marcadores pronósticos de CP en la biopsia como son la fracción de cilindros afectados y el grado de Gleason.

3.1 Estrés oxidativo en plasma seminal y fracción de cilindros afectados

Los sujetos con biopsia positiva fueron divididos en dos subgrupos; varones con más del 50% de los cilindros afectados por neoplasia y varones con una afectación menor o igual al 50% de los cilindros.

De los 23 varones con biopsia positiva, 10 de ellos (43,5%) presentaban afectación menor o igual al 50% y 13 varones, mayor al 50% (56,5%).

El análisis comparativo, mediante la prueba de *Mann-Whitney*, no objetivó diferencias estadísticamente significativas entre ambos subgrupos en cuanto a los niveles de ERO en plasma seminal (tabla 24), $p = 0,343$.

Tabla 24. Análisis por subgrupos de sujetos con biopsia positiva en función de la fracción de cilindros afectados por neoplasia (n = 23).

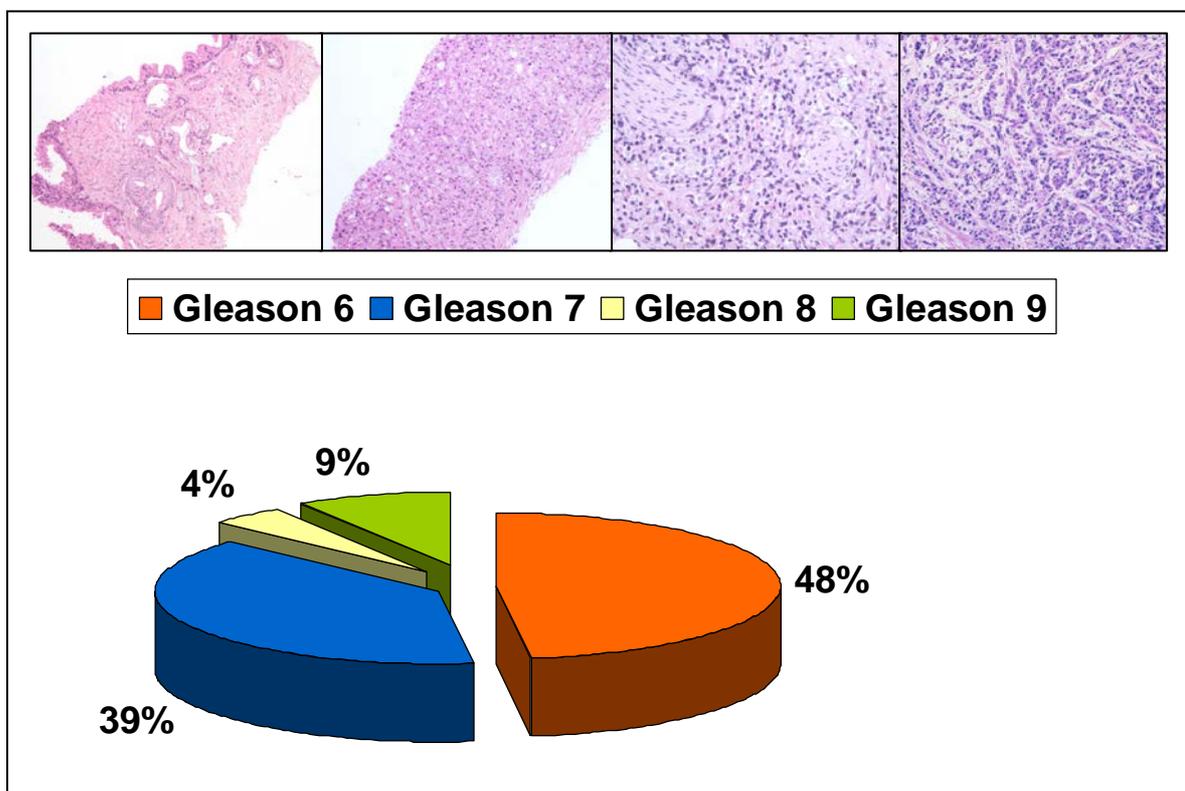
Fracción cilindros afectados	N	Mediana ERO	Rango promedio ERO	p-valor
≤ 50% cilindros afectados	10	0,0325	10,45	0,343
> 50% cilindros afectados	13	0,0450	13,19	

3.2 Estrés oxidativo en plasma seminal y grado de Gleason

Los sujetos con biopsia positiva fueron divididos en cuatro subgrupos en función del grado de Gleason de la biopsia.

La **figura 29** muestra la distribución de los sujetos del estudio en función del grado de Gleason de la biopsia: 11 varones presentaron Gleason 6 (48%); 9 varones, Gleason 7 (39%); un solo sujeto presentó grado de Gleason 8 (4%) y dos sujetos, grado de Gleason 9 (9%). Se muestran, también, imágenes histopatológicas de cada grado de Gleason hallado en los sujetos del estudio por cortesía de la Dra. Irmgard Costa.

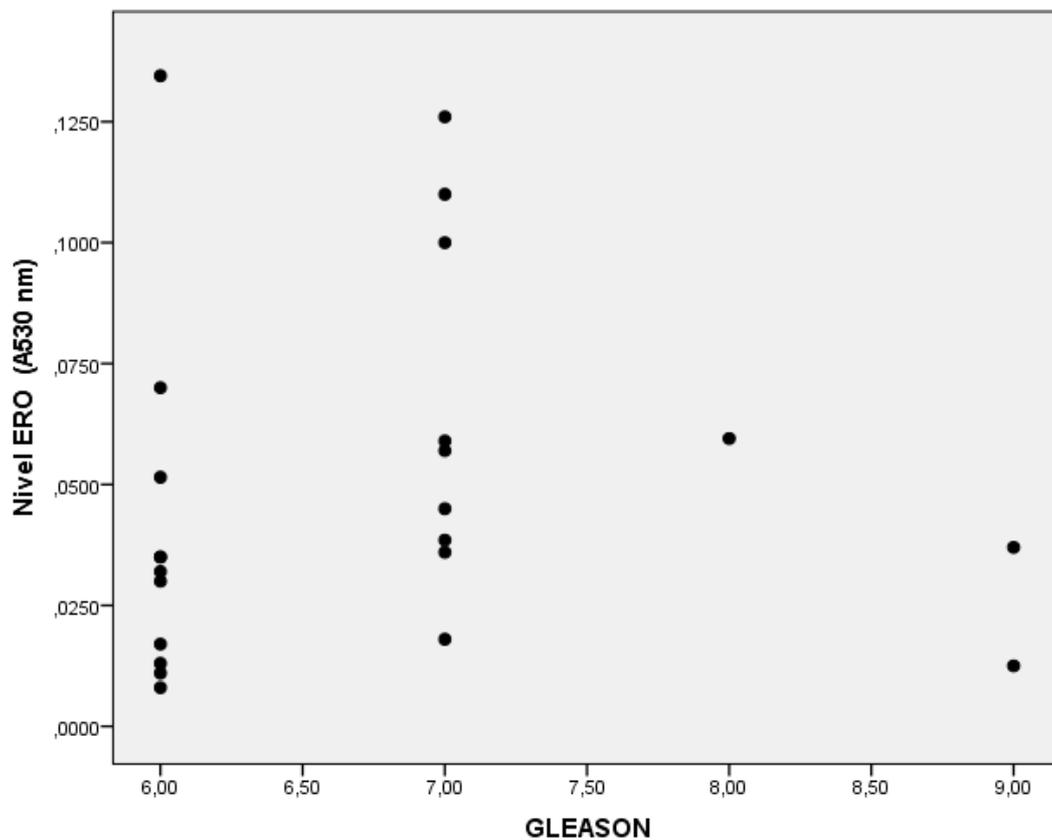
Figura 29. **Distribución** de los **sujetos** del estudio en función del **grado de Gleason** de la biopsia. De izquierda a derecha: Tinción H&E x100 aumentos de adenocarcinoma grado de Gleason 6 y 7 y tinción H&E x400 aumentos de adenocarcinoma grado de Gleason 8 y 9. Cortesía Dra. Costa. Servicio Patología. Parc Taulí Sabadell. Hospital Universitario.



Se realizó el estudio comparativo entre los niveles de ERO en plasma seminal y el grado de Gleason en la biopsia mediante análisis de correlación lineal.

Como puede observarse en la [figura 30](#), el análisis de regresión lineal simple no reveló diferencias significativas entre los diferentes grados de Gleason hallados en las biopsias de los sujetos del estudio y los niveles de ERO ($R^2 = 0,001$; $p = 0,913$).

Figura 30. **Análisis de regresión lineal.** Se representan los niveles de ERO medidos en unidades de absorbancia (eje de ordenadas) en función del grado Gleason 6, 7, 8 y 9 (eje de abcisas) (n = 23).



4. ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA SEMINAL Y OTRAS VARIABLES RELEVANTES.

4.1 Estrés oxidativo en plasma seminal y edad

Se realizó el análisis por subgrupos de edad tomando como punto de corte la edad de 60 años. Se formaron, por tanto, dos subgrupos de varones:

- Subgrupo "junior", constituido por los varones de edad menor o igual a 60 años
- Subgrupo "senior", en el que se incluyeron los varones mayores de 60 años.

Se realizó un estudio comparativo de los niveles de ERO en plasma seminal entre los dos subgrupos de edad.

También se contrastaron las diferencias de las variables "PSA plasmático total" y "volumen prostático" entre ambos subgrupos.

El análisis estadístico mediante la prueba de *Mann-Whitney* no halló diferencias significativas entre ambos subgrupos de edad en cuanto a los niveles de ERO en plasma seminal ($p=0,524$), ni en cuanto a los niveles de PSA total ($p=0,628$) ni al volumen prostático ($p=0,864$) ([tabla 25](#)).

Tabla 25. Diferencias en cuanto a los parámetros de **ERO** en **plasma seminal**, PSA total y volumen prostático en relación con la **edad**. Prueba de *Mann-Whitney* (n=45).

	Edad	N	Mediana	Rango promedio ERO	p-valor
Nivel de ERO (A 530 nm)	≤ 60	21	0,040	24,33	0,524
	> 60	24	0,036	21,83	
PSA total (ng/ml)	≤ 60	21	6	22,00	0,628
	> 60	24	7	23,88	
Volumen prostático (ml)	≤ 60	21	36	22,64	0,864
	> 60	24	37	23,31	

4.2 Estrés oxidativo en plasma seminal y tacto rectal

Se dividieron los sujetos en dos subgrupos en función de la consistencia del tacto rectal; subgrupo de tacto no sospechoso de malignidad (próstata de consistencia normal) y subgrupo de tacto sospechoso de malignidad (nódulo/s palpable/s).

Se compararon los niveles de ERO de plasma seminal de ambos grupos mediante la prueba de *Mann-Whitney*.

Como se muestra en la [tabla 26](#), el análisis estadístico no halló diferencias significativas en cuanto a los niveles de ERO en plasma seminal entre ambos subgrupos de consistencia de tacto rectal ($p = 0,118$).

Tabla 26. Diferencias en cuanto a **los niveles de ERO** en plasma seminal en función de la **consistencia del tacto rectal** (n = 45).

Tacto Rectal	N	Mediana ERO	Rango promedio ERO	p-valor
No sospechoso	40	0,039	24,09	0,118
Sospechoso	5	0,030	14,30	

4.3 Estrés oxidativo en plasma seminal y volumen prostático

Finalmente, los sujetos del estudio fueron clasificados en función del volumen prostático:

- Subgrupo de varones con próstata *pequeña* (volumen inferior a 30 ml).
- Subgrupo de varones con próstata *mediana* (volumen entre 30 y 60 ml).
- Subgrupo de varones con próstata *grande* (volumen superior a 60 ml).

Se compararon los niveles de ERO de plasma seminal entre los tres subgrupos mediante la prueba de *Kruskal-Wallis*.

Como se muestra en la [tabla 27](#), no se hallaron diferencias significativas de los niveles de ERO en plasma seminal entre los tres subgrupos ($p = 0,634$).

Dado que no se encontraron diferencias significativas, no se realizó la prueba de comparación múltiple por parejas de Dunn.

Tabla 27. Diferencias en cuanto a los **niveles de ERO** en plasma seminal en función del **volumen prostático** (n=45).

Volumen prostático	N	Mediana ERO	Rango promedio ERO	p-valor
Pequeña	16	0,037	24,50	0,634
Mediana	25	0,038	22,92	
Grande	4	0,031	17,50	

Discusión

DISCUSIÓN

El CP es la neoplasia más frecuente y la primera causa de muerte por cáncer en el varón a nivel mundial¹⁻³. Sin embargo, dado su peculiar comportamiento biológico o historia natural, cuando la enfermedad se diagnostica en un estadio inicial, las diferentes modalidades de tratamiento radical permiten una elevada tasa de curación¹³⁴⁻¹³⁶. La cifra de PSA plasmático total es, actualmente, el biomarcador diagnóstico de CP más ampliamente utilizado¹⁵ aunque posee grandes limitaciones atribuibles a su falta de especificidad^{14,15,137} y a que no existe un nivel de PSA por debajo del cual el CP pueda ser excluido^{14,15}. La biopsia prostática, prueba de elección para la confirmación diagnóstica^{30,39-41}, también tiene limitaciones importantes, tales como el error en el muestreo^{46,55-60}, su invasividad con generación de ingresos hospitalarios⁶³ e incluso disfunción eréctil¹³⁸. Por tanto, dado que en la actualidad el CP sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública, existe la necesidad ineludible de descubrir y desarrollar nuevos biomarcadores no tisulares que faciliten el diagnóstico del CP. De ahí surge el gran interés en extraer la máxima información de fluidos biológicos de fácil acceso y en contacto con la glándula como la sangre, la orina o el líquido seminal.

En la hipótesis del presente estudio se plantea que exista la posibilidad de un aumento significativo de los niveles de estrés oxidativo o niveles de ERO en el plasma seminal en varones con CP respecto a varones sin CP. Esta hipótesis se basa, en primer lugar, en los numerosos ensayos experimentales y clínicos que evidencian una asociación significativa entre estrés oxidativo y cáncer⁸⁴⁻⁹⁵ y, en concreto, en el CP^{84,87-89,94}. En segundo lugar, la literatura señala que el líquido seminal es una de las fuentes más prometedoras para la búsqueda de nuevos biomarcadores de CP, dado que, combina la alta proximidad al tejido origen de la neoplasia con una excelente accesibilidad⁹⁰⁻⁹².

La relación entre CP y líquido seminal ya había sido descrita por Gardiner¹³⁹ y Barren¹⁴⁰, los cuales, identificaron células prostáticas malignas en semen utilizando técnicas sencillas de citología y citometría. Posteriormente, el mayor conocimiento de la arquitectura y función excretora del epitelio prostático, promovió el interés de otros autores por el análisis del semen a nivel molecular; Obiezu¹⁴¹ cuantificó la secreción seminal de la proteína kallicreína 4 y la relacionó con su presencia aumentada en tejido prostático, Acevedo¹⁴² aisló por primera vez el PSA en semen y, en 2013, Neuhaus¹⁰⁸ identificó, mediante secuenciación, proteínas y péptidos expresados diferencialmente en el líquido seminal de varones con CP respecto a varones sanos. También cabe destacar la búsqueda de biomarcadores de CP en el fluido prostático recogido en la primera fracción de orina¹⁴³; grupos pioneros en este cometido como el de Iwakiri¹⁴⁴ y Clements¹⁴⁵ reportaron que la primera fracción de orina evacuada contiene la mayor concentración de células prostáticas, con resultados comparables en el eyaculado y en lavados uretrales. Posteriormente, Hessels¹⁴⁶ identificó en orina el gen DD3^{PCA3}, procedente de células tumorales descamadas al fluido prostático desde el sistema de ductos prostáticos hacia la uretra tras masaje prostático.

Coincidiendo con trabajos previos sobre validación de biomarcadores diagnósticos de CP^{69,70,143-146}, la inclusión de los participantes en el presente estudio se realizó a partir de la sospecha clínico-analítica de CP. Este diseño de estudio, tomando una muestra de la población de riesgo, es el más utilizado para la evaluación de la asociación entre enfermedad y biomarcador diagnóstico^{147,148}, ya que, se basa en el reclutamiento de sujetos con sospecha de la enfermedad, tal y como se presentan en la práctica clínica habitual. Los varones mayores de 75 años fueron excluidos, para evitar que el factor “edad” pudiera influir en los niveles de ERO seminal, dada la relación, descrita por Turrens⁹⁶ y Balaban⁹⁷, entre envejecimiento tisular y reducción de la eficacia de los mecanismos de detoxificación de ERO. También se excluyeron los varones con aneyaculación o incapacidad de recoger un volumen de muestra seminal adecuado.

La causa más frecuente de aneyaculación en nuestro medio es la terapia alfa-bloqueante para el control de los síntomas del tramo urinario inferior de vaciado secundarios a HBP¹⁴⁹. Para evitar la reaparición de síntomas miccionales por abandono del tratamiento se excluyeron los varones en terapia alfa-bloqueante y los varones con otras causas de aneyaculación, tales como, la cirugía prostática desobstructiva. El antecedente de vasectomía no fue un criterio de exclusión, ya que, la ausencia de espermatozoides no imposibilitaba el análisis de los niveles de ERO en plasma seminal. Los varones con antecedente de biopsia prostática previa también se descartaron, ya que, el muestreo tras una primera biopsia negativa ha de ser mayor, incluyendo la zona transicional prostática y tomando un mínimo de 16 a 22 cilindros de tejido¹⁵⁰. Se excluyeron los pacientes con antecedente reciente de infección urinaria, prostática o manipulación de la vía urinaria, por la relación entre el estrés oxidativo y los procesos de inflamación tisular observada por varios autores^{99,100}. Y como último criterio de exclusión, con el objetivo de homogeneizar al máximo las condiciones del medio próstato-seminal previa recogida de la muestra, los pacientes debían eyacular una semana antes de la toma de la muestra, con abstinencia eyaculatoria hasta la recogida de la muestra, siendo la biopsia la última muestra a obtener; tal y como se realiza en otros ensayos de detección de biomarcadores: PCA3, gen de fusión TMPRSS2-ERG, exosomas, etc.^{68-70,146-148}.

El análisis descriptivo del estudio sugiere que el perfil de sujeto con sospecha de CP es el de un varón en el inicio de la década de los 60 años, con un PSA total plasmático inferior a 10 ng/ml y con un tacto prostático no sospechoso de neoplasia, hecho que coincide con el perfil clínico que establecen otros estudios sobre biomarcadores de CP^{68,69,146}.

Para el análisis de los niveles de estrés oxidativo en plasma seminal, principal variable del estudio, se dividió la muestra total de varones en dos subgrupos, según el resultado de la biopsia prostática; subgrupo de varones con biopsia negativa para malignidad y subgrupo de varones con biopsia positiva. El número de sujetos de cada subgrupo fue similar; 51,2% con biopsia positiva frente a un 48,8% con biopsia negativa.

La mayoría de sujetos no neoplásicos presentaron hiperplasia adenomatosa en la biopsia, de acuerdo con la elevada prevalencia de este patrón histopatológico en el varón a partir de los 50 años¹⁵¹. Se hallaron dos varones no neoplásicos con lesión tipo ASAP correspondiente al 3% del total de varones biopsiados, valor que coincide con la incidencia de ASAP en la población⁴². La prueba de *Mann-Whitney* no halló diferencias de los niveles de ERO en el grupo de varones con ASAP respecto al grupo no neoplásico sin ASAP. Este subanálisis se realizó porque se consideró de interés saber si esta entidad, precursora del CP aunque no maligna en sí misma⁴² se relacionaba con un mayor nivel de ERO que los varones con biopsias de patrón claramente benigno.

No hubo pacientes en cuyas biopsias se detectaran focos de inflamación activa aguda o crónica moderada o marcada aunque, en caso de haberse detectado, habrían sido descartados para evitar el potencial efecto oxidativo que la inflamación pudiera ejercer sobre el tejido prostático^{99,100,152}.

Según la hipótesis propuesta, la célula prostática neoplásica excreta mayores niveles de ERO a la luz del acino glandular que la célula prostática sana, y ello, se refleja en una mayor actividad oxidativa seminal. Sin embargo, los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas de los niveles de ERO en plasma seminal determinados mediante test NBT en los varones con CP respecto a los varones sin CP en la biopsia, lo cual, contrasta con los datos de Bostwick⁸⁷, Oberley⁸⁸ y Frohlich⁸⁹, estudios que sugieren que la actividad oxidativa tisular se halla elevada en procesos de carcinogénesis prostática.

Tras una revisión exhaustiva de la literatura se ha observado que existen escasas publicaciones sobre estatus oxidativo en muestras no invasivas y CP y, de éstas, sólo una minoría aportan datos concretos sobre la metodología de cuantificación del estrés oxidativo; Battisti¹⁵³ utilizó los niveles plasmáticos de actividad de las enzimas catalasa y superóxido-desmutasa para cuantificar actividad enzimática antioxidante, hallando niveles inferiores en varones con CP respecto a varones sin CP. Por contra, el grupo de Hoque¹⁵⁴, tomando niveles plasmáticos de proteínas con grupo carbonilo, no halló correlación entre dichos niveles y la presencia de CP en la biopsia, concluyendo que, posiblemente, los niveles de proteína oxidada no reflejen de manera suficientemente precisa el daño oxidativo que tiene lugar en la próstata. De manera similar a los resultados del presente estudio, Oberley⁸⁸ observó que los niveles de productos de daño oxidativo a nivel celular similares en el epitelio acinar prostático sano y en el CP primario clínicamente localizado pero significativamente más bajos en comparación con el CP metastásico.

A diferencia de los estudios sobre estrés oxidativo y CP, los trabajos sobre estrés oxidativo y líquido seminal aportan las mayores referencias sobre metodología de cuantificación de ERO, dada la conocida relación entre el exceso de ERO en el medio seminal y la alteración de la función espermática^{111,112}, así como, su consecuente implicación en el tratamiento del varón infértil¹⁵⁵. Los ensayos de quimioluminiscencia de Plante¹⁵⁶, que cuantificó las ERO liberadas al líquido seminal por espermatozoides y neutrófilos del eyaculado a través de la actividad catalasa y superóxido dismutasa o las observaciones del grupo de De Grey¹⁵⁷, que evaluó las ERO presentes en la membrana plasmática del espermatozoide mediante ensayo NBT, constituyen algunos ejemplos. Sin embargo, no se han hallado datos de cuantificación de ERO liberadas por la célula prostática epitelial al líquido seminal, ni publicaciones sobre la relación entre los niveles de ERO seminales y la presencia de CP.

La únicas referencias sobre la relación entre semen, estrés oxidativo y CP proceden de los trabajos de Ronquist¹¹³ y Tappel¹¹⁴, en los que se sugiere que el epitelio prostático secreta unas estructuras denominadas prostasomas cuya acción oxidante podría inducir, sobre el propio epitelio, fenómenos de carcinogénesis. Ronquist¹¹³ define los prostasomas como gránulos de secreción submicrónicos producidos, almacenados y secretados por las células epiteliales de la próstata humana, cuya principal función es proteger y promover la motilidad progresiva de los espermatozoides a lo largo del tracto genital femenino en su camino hacia el óvulo. Sin embargo, a partir de los 50 años, los prostasomas parecen volverse contra la célula huésped, propiciando la transición de la célula epitelial prostática normal a célula neoplásica y, con ello, sentar los cimientos de la elevada prevalencia del CP del varón relacionada con la edad. Tappel¹¹⁴ atribuye este mecanismo de carcinogénesis prostática a procesos oxidativos inducidos por enzimas hidrolíticas presentes en el interior de los prostasomas.

Por tanto, aunque se ha demostrado un metabolismo oxidativo diferencial en células malignas del epitelio secretor prostático con respecto a células prostáticas sanas⁸⁸, este hecho, no se ha podido extrapolar a la actividad oxidativa del plasma seminal determinada mediante el test NBT en la muestra de varones analizada en el presente estudio. La ausencia de asociación entre los niveles de ERO en plasma seminal y el resultado de la biopsia prostática, podría deberse a varios factores: en primer lugar, a factores relacionados con las características de las muestras analizadas (plasma seminal y biopsia prostática) y, en segundo lugar, a factores referidos a la metodología de trabajo para la medición del estrés oxidativo seminal. Estos factores, a su vez, constituyen limitaciones del presente estudio y se exponen a continuación.

Factores relacionados con características de las muestras analizadas

- El semen eyaculado se compone de una fracción corpuscular formada por espermatozoides, leucocitos, células germinales inmaduras y células epiteliales exfoliadas y de una fracción plasmática producida en las glándulas sexuales accesorias, es decir, en vesículas seminales, próstata y glándulas bulbo-uretrales¹⁰⁵. El presente trabajo se centró en el análisis de las ERO presentes en la fracción plasmática, la cual, contiene la secreción de la glándula prostática, tejido diana a estudio, pero ¿qué fracción de ERO procede únicamente de la secreción prostática en cada muestra seminal? No existen estudios que pueden dar una respuesta exacta a esta pregunta, aunque sí aproximada; el grupo de Ronquist¹⁵⁸, mediante la determinación de cationes bivalentes de magnesio, zinc y calcio en semen, sugiere que las dos primeras fracciones del eyaculado representan la contribución prostática, mientras que las dos últimas, representan el aporte de las vesículas seminales, en cuyo epitelio, se ha documentado que existe un estado oxidativo basal elevado⁸⁸. Por otra parte, los ensayos con biomarcadores urinarios, cuyo objetivo es detectar genes y proteínas procedentes de células prostáticas neoplásicas¹⁴⁶⁻¹⁴⁸, ofrecen una alternativa a este problema, ya que, trabajan con el plasma seminal tras masaje prostático estandarizado¹⁵⁹ en lugar de hacerlo con la muestra del semen total eyaculado, lo cual, aumenta la seguridad de que, dicha muestra, proceda de la próstata, pero no al 100%.

Por tanto, el presente trabajo coincide con las observaciones de Cazares¹⁰⁷ en que el estudio de biomarcadores específicos de CP a través del análisis de las secreciones prostáticas resulta muy complejo, debido a la dificultad para aislar la secreción prostática del resto de componentes del plasma seminal.

- Otro factor limitante fue la sensibilidad diagnóstica de la biopsia prostática, segunda muestra biológica analizada en el presente estudio. Esta limitación, basada en el hecho de tomar la biopsia prostática como referencia estándar para el diagnóstico de CP, también está presente y se ha descrito ampliamente en numerosos ensayos de validación clínica de biomarcadores diagnósticos de CP¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

En el presente estudio se tomaron 10 biopsias de la zona periférica lateral y media, zonas de máxima detección de focos de CP según la literatura actual¹⁶⁰. Sin embargo, la baja sensibilidad de la biopsia prostática⁵⁵⁻⁵⁸, así como, su elevada tasa de falsos negativos^{56,60,161} podrían explicar, en parte, la ausencia de diferencias significativas en los niveles de ERO en plasma seminal entre los subgrupos.

Según Djavan⁵⁵, las BP conducen frecuentemente a muestras no representativas, en las que sólo se detecta CP en el 30% de los varones con niveles elevados de PSA. Otras series muestran sensibilidades que oscilan entre el 45 al 77%^{56,57}. En este sentido, uno de los trabajos de mayor trascendencia fué el realizado en 2007 por Haas¹⁶⁰; el autor y su equipo investigaron la sensibilidad de varios regímenes de biopsia, con extracción de diferente número de cilindros en diferentes localizaciones para la detección de CP a partir de especímenes procedentes de autopsias. Se observó que la sensibilidad de las biopsias de 12 cilindros (que incluían zona lateral y media periférica) era similar a la de las biopsias de 18 cilindros (que además de la zona periférica incluían la zona central), concluyendo que la exactitud de la detección del CP depende en mayor grado de la localización anatómica de donde se toman las biopsias que del número de biopsias tomadas, ya que, la mayoría de los cánceres se detectaron en biopsias de la zona periférica lateral y media. Recientemente se ha comunicado una tasa de un 33% de focos de CP clínicamente significativo en el lóbulo contralateral de piezas de prostatectomía radical que la biopsia por dodecantes no detectó¹⁶¹, hecho que coincide con los datos de Eichler⁶⁰ en los que la tasa de falsos negativos de la BP asciende hasta el 30%. Otras series señalan una tasa de falsos negativos de la biopsia incluso superior al 30% a pesar de aumentar el número de cilindros obtenido¹⁶².

Factores relacionados con la metodología de trabajo para la medición del estrés oxidativo

- A pesar de que existen informes de que, sólo una pequeña proporción de ERO espermático, se libera a nivel extracelular¹⁵⁶, para evitar la posible interferencia de las ERO procedentes de la fracción celular en las ERO plasmáticas, se separaron ambas fracciones en cada muestra mediante centrifugación, desechando la fracción celular. No obstante, se ha descrito que, la técnica de centrifugación, puede aumentar la producción de ERO espermático¹⁶³. Por tanto, los niveles de ERO de las muestras de plasma seminal pudieron alterarse por el propio proceso de separación de las fracciones seminales.
- En la mayoría de publicaciones de referencia, el estrés oxidativo se cuantifica mediante detección de la actividad enzimática REDOX, a través de sondas quimioluminiscentes como la lucigenina¹¹⁸, dada la gran implicación de los sistemas enzimáticos en los procesos de producción y detoxificación de ERO^{116,117}. Sin embargo, en el presente estudio, se optó por la cuantificación del estrés oxidativo mediante el test NBT, lo cual, es debido a dos motivos. En primer lugar, porque los ensayos de quimioluminiscencia presentan importantes inconvenientes; las sondas son extremadamente sensibles a reaccionar con otros sustratos presentes en el medio y sus unidades molares son difíciles de calibrar¹¹⁹. En segundo lugar, porque Aitken¹⁶⁴ y Krausz¹⁶⁵, a través de sus múltiples observaciones sobre la relación entre leucospermia e infertilidad masculina, proponen el ensayo NBT como alternativa más sencilla y económica para cuantificar las ERO seminales y, tanto la sencillez, como la reproducibilidad práctica de la técnica de medición de ERO, formaban parte de la justificación de este trabajo.

El ensayo NBT es un método indirecto de cuantificación de ERO que aprovecha una reacción química (reducción del nitroazul de tetrazolio) para agotar las ERO presentes en una muestra, dando lugar a un producto (cristales insolubles de formazán) cuya absorbancia se correlaciona con la proporción de ERO en dicha muestra^{87,125,126}. Uno de los inconvenientes del uso de esta técnica es que, las publicaciones en las que se utiliza el ensayo NBT, al tener como objetivo el estudio de poblaciones de varones infértiles, se centran en el análisis de los niveles intraespermáticos de ERO, descartando el plasma seminal¹²⁵⁻¹³², de modo que se desconocen sus valores de referencia o rangos de normalidad en esta fracción del líquido seminal. Otra de las posibles interpretaciones del presente resultado podría atribuirse a que el método empleado no haya sido suficientemente sensible para detectar diferencias sutiles de los niveles de ERO entre varones con CP y varones sin CP en la biopsia. Este inconveniente también está presente en otros trabajos como el de Hoque¹⁵⁴, previamente expuesto, o el de Bostwick⁸⁷, que utilizó varias técnicas de cuantificación de ERO: secuenciación de ADN, ensayo inmunohistoquímico, ensayos NBT, etc. para relacionar la actividad enzimática antioxidante y el daño oxidativo tisular con CP en piezas de prostatectomía.

- El grupo de Tunc¹³¹ observó que, el plasma seminal exento de fracción celular, tiene capacidad de reducir el compuesto NBT a formazán. Esto puede deberse a la existencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno y de NADPH en el plasma seminal, potenciales promotores de fenómenos de auto-oxidación¹¹⁹ y cuya presencia en las muestras seminales del estudio no fué determinada. Tampoco se cuantificó el efecto antioxidante del plasma seminal procedente de sistemas enzimáticos, como la superóxido desmutasa y la glutatión peroxidasa¹⁵⁵ y de sistemas no enzimáticos, como el ácido ascórbico¹¹⁶.

Se puede decir, por tanto, que las mediciones del estrés oxidativo en muestras biológicas no son sencillas, ni siquiera con métodos directos^{120,121} y que cuantificar de manera exacta el cómputo global de los elementos oxidantes y antioxidantes en cada muestra de plasma seminal es muy complejo, así como, conocer qué fracción de ERO es atribuible a la presencia de CP, qué fracción procede de otros fenómenos, tales como, la auto-oxidación y qué fracción es neutralizada por la maquinaria antioxidante seminal.

Por otro lado, Oberley⁸⁸ realizó una observación interesante a partir de estudios que relacionan daño oxidativo con CP, y es que, la mayoría de ellos, cuantifican la actividad oxidativa a nivel tisular y no a nivel celular. Por tanto, cuando se trata de medir niveles de ERO quizás lo ideal fuera realizarlo a nivel intracelular, dado que, se trata de metabolitos muy reactivos cuyos niveles pueden variar momentáneamente. El conocimiento de los niveles exactos de ERO podría ser determinante para interpretar sus efectos biológicos, ya que, existe evidencia que indica que la generación de ERO puede inducir, por determinadas vías de señalización, no sólo fenómenos de supervivencia celular sino también fenómenos de apoptosis en células neoplásicas prostáticas^{166,167}; Afanas'ev¹⁶⁸ sugiere que los efectos positivos del estrés oxidativo frente a los negativos podrían depender, concretamente, de los niveles de ERO: pequeños niveles estimularían la supervivencia celular y altos niveles podrían resultar en apoptosis, considerándose el cómputo total de ERO un arma de doble filo.

Una vez valorados los factores limitantes del presente trabajo, se analizó la posible relación entre el resultado de la biopsia prostática y otras variables descriptivas: edad, PSA plasmático total y volumen prostático.

Los varones con biopsia positiva fueron significativamente más mayores que los varones con biopsia negativa; de acuerdo con los datos de la literatura existe mayor riesgo de CP a medida que aumenta la edad^{97,169}.

En el presente estudio, los varones con biopsia positiva no presentaron mayor valor promedio de PSA plasmático total que los varones con biopsia negativa, lo cual, es coherente con los resultados de Ornstein¹⁵¹, que estimó que el 75% de los hombres con PSA total elevado no presentan CP, sino otras alteraciones histopatológicas como HBP, inflamación o infarto prostático. El estudio del nivel de PSA total se consideró de interés para conocer si dicho valor era más elevado en varones neoplásicos, sin embargo, el PSA total, dentro del rango de sospecha (4 ng/ml-20 ng/ml), no constituyó un parámetro diferencial entre los dos subgrupos, siendo congruente dicho resultado al obtenido por Kanyong⁶⁵, que señala que la mayoría de hombres diagnosticados de CP presentan niveles de PSA sérico en el rango entre 2,5 y 10 ng/ml.

Posteriormente, se evaluó la mediana del volumen prostático ecográfico transrectal por subgrupos según el resultado de la biopsia, sin observar diferencias significativas entre ambos. El análisis de este parámetro se realizó porque algunos autores han observado que puede influir en la sensibilidad de la biopsia; Uzzo¹⁷⁰ reportó, en una revisión de 1.021 biopsias por sextantes, que la tasa de biopsias positivas fue significativamente mayor en hombres con un volumen prostático inferior a 50 ml (38%) en comparación con hombres que tenían volúmenes superiores o iguales a 50 ml (23%). El grupo de Remzi¹⁷¹ halló mayor probabilidad de segunda biopsia positiva tras una primera negativa a mayor volumen prostático, es decir, menor sensibilidad diagnóstica de la primera biopsia a mayor volumen prostático.

En el presente estudio no se hallaron diferencias significativas en la mediana del volumen prostático por subgrupos de biopsia, con lo cual, se podía considerar una sensibilidad de la biopsia basal similar entre ambos subgrupos, según los datos previos.

El primero de los objetivos secundarios del presente trabajo fué evaluar la utilidad de los niveles de estrés oxidativo en plasma seminal como marcador pronóstico de CP. Para ello, se estudió su posible relación con parámetros histológicos de riesgo de recurrencia, tales como, la carga tumoral o el grado de diferenciación celular^{45-48,52-54}. La carga tumoral se estudió mediante la fracción de cilindros afectados por tumor, estableciéndose dos subgrupos: varones con fracción de cilindros afectados inferior o igual al 50% y varones con fracción de cilindros afectados superior al 50%. También se clasificaron los varones con biopsia positiva en cuatro subgrupos, según la puntuación de Gleason observada en la biopsia: grupo Gleason 6, grupo Gleason 7, grupo Gleason 8 y grupo Gleason 9. Los sujetos de peor pronóstico (varones con afectación de más del 50% de los cilindros y varones con grados de Gleason 8 y 9) no presentaron mayores niveles medios de ERO que los varones de mejor pronóstico histológico. El análisis de regresión lineal no evidenció correlación entre los niveles de ERO y el grado Gleason. Por un lado, estos datos contrastan con algunos de los publicados en la literatura, según los cuales, mayores niveles de ERO se asocian a cáncer de peor pronóstico; Nguyen⁹⁴ observó que la sobreexpresión de la proteína de membrana tipo 1 metaloproteasa (MT1-MMP) en células malignas prostáticas, a través de la inducción de un incremento de los niveles de ERO, daba lugar a un fenotipo de CP más agresivo; Mori¹⁷² informó sobre la conversión de células epiteliales mamarias a un fenotipo más maligno al exponerlas a concentraciones de peróxido de hidrógeno durante un periodo prolongado de tiempo. En contra de estos resultados, Battisti¹⁵³ no halló diferencias en el estatus oxidativo de los pacientes con CP localizado o metastásico.

Por otro lado, los resultados del subanálisis del presente trabajo fueron esperables, dada la ausencia inicial de relación entre los niveles de ERO en plasma seminal a través del test NBT y el diagnóstico de CP y la limitación que supone un menor número de varones analizados por subgrupo para este objetivo secundario. Sin embargo, se deseaba conocer si los niveles de ERO en plasma seminal, en el grupo de biopsia positiva, presentaban una tendencia al aumento en los varones con CP de peor pronóstico. Para entender la disparidad de los resultados obtenidos con respecto a los datos de la literatura previa, se debe tener en cuenta que los estudios mencionados^{94,172} utilizaron cultivos celulares de tumores inducidos en el modelo animal (ratón), no biopsias prostáticas en humanos y la medición de ERO se realizó a nivel intracelular con técnicas de citometría de flujo y microscopio de fluorescencia, es decir, se trata de ensayos no comparables a efectos de tipo de diseño de estudio y metodología de medición de estrés oxidativo.

Otro de los objetivos secundarios fué analizar la relación del estrés oxidativo en plasma seminal con otras variables relevantes en el varón con sospecha de CP: edad, tacto rectal y volumen prostático.

La edad avanzada se asocia a una mayor tasa de incidencia de enfermedades comunes de la próstata incluyendo la HBP y el CP^{151,173}. En primer lugar se estableció la edad de 60 años como punto de corte arbitrario. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre el subgrupo "junior" y el subgrupo "senior" en cuanto a los niveles de PSA plasmático total ni en cuanto al volumen medio prostático, es decir, los varones más mayores de la población a estudio no presentaron mayores niveles de PSA total ni mayor volumen prostático que los más jóvenes, pero, ¿qué fué de los niveles de estrés oxidativo del líquido seminal en relación a la edad?.

Según la literatura, los niveles de ERO en los tejidos aumentan con la edad, ya que, se ha observado que los radicales libres, a través del daño continuo a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, están involucrados en la producción de los cambios asociados al envejecimiento celular^{79,169}. Sin embargo, a diferencia de los datos publicados previamente, en el presente estudio no se observaron diferencias en cuanto al estrés oxidativo en plasma seminal mediante el test NBT entre el grupo de varones de edad inferior a 60 años y el grupo de varones mayores de 60 años. Del mismo modo que sucede con los niveles de ERO y los factores de mal pronóstico histológico, la mayoría de los estudios que relacionan ERO y envejecimiento se basan en ensayos con células de ratón cultivadas con oxidantes, antioxidantes o agentes que alteran procesos específicos⁹⁵⁻⁹⁸, especialmente, las vías de reparación del ADN¹⁷⁴, por tanto, hay que tener en cuenta que las asociaciones halladas en el modelo animal pueden no ser extrapolables al modelo humano, ya que, las vías de respuesta al daño oxidativo pueden diferir entre especies. Por otra parte, las conclusiones basadas en cultivos celulares humanos *in vitro* pueden no reflejar los procesos o las respuestas *in vivo*.

En lo que respecta a la relación estrés oxidativo - tacto rectal (TR), no se hallaron diferencias significativas en los niveles de ERO entre los grupos TR sospechoso / TR no sospechoso, por tanto, la determinación del estrés oxidativo en plasma seminal mediante el test NBT no contribuyó a mejorar la sensibilidad de la prueba del TR en el sujeto con sospecha analítica de CP. La palpación digital prostática constituye una herramienta de uso rutinario en la detección clínica de CP, ya que, la mayoría de tumores prostáticos se localizan en la zona periférica¹⁰. Según la literatura, en aproximadamente el 18% de los varones puede identificarse un CP a partir de un TR sospechoso^{10,11}. Del total de sujetos incluidos en el estudio, sólo el 11,1% presentaron un TR sospechoso de CP, representando un 21,7% de aquéllos con biopsia positiva. No obstante, todos los varones con TR sospechoso, presentaron CP. Por tanto, la prueba del TR fué una herramienta de elevado valor predictivo positivo en la muestra analizada, aunque de baja sensibilidad, tal y como señala la literatura.

La presencia de un tumor palpable al TR en forma de nódulo pétreo o indurado se asocia a mayor riesgo de tumor indiferenciado, es decir, a peor pronóstico¹⁰. Este dato se observó en los sujetos del presente estudio; los varones que presentaron un TR sospechoso obtuvieron los datos histológicos de peor pronóstico (afectación de > 50% de los cilindros y grados de Gleason 8 y 9).

Finalmente, el volumen prostático también constituyó un parámetro a analizar, pues la hiperplasia adenofibromiomatosa es un fenómeno fisiopatológico del varón que acontece, casi de forma constante, a partir de los 50-60 años¹⁴⁹ y que, clásicamente, puede asociarse a un mayor estrés oxidativo prostático¹⁷⁵. Los varones del presente estudio con grandes volúmenes prostáticos (Vol. > 60 ml) no presentaron niveles de ERO superiores a los de varones con próstatas de pequeño volumen (Vol. < 30 ml). En una revisión reciente de la literatura realizada por Minciullo y cols.¹⁷⁶ se concluye que los parámetros de estrés oxidativo son más prominentes en pacientes con CP que en pacientes con HBP y que en controles, no existiendo datos suficientes para confirmar una secuencia de HBP a CP mediada por un exceso de ERO.

A pesar de los resultados obtenidos en base a la hipótesis formulada en este trabajo, se cree conveniente seguir avanzando en el desarrollo de biomarcadores de CP relacionados con el estrés oxidativo que sean trasladables a la práctica clínica, dada la documentada presencia de este fenómeno en la carcinogénesis prostática, la ausencia de invasividad en la obtención de muestras seminales y la sencilla aplicabilidad del ensayo NBT para la detección de ERO.

El conocimiento y evaluación exhaustiva de los factores limitantes del presente estudio podría resultar fundamental como punto de partida para definir nuevas líneas de investigación.

Uno de los principales aspectos cuestionables de este trabajo es el uso de la biopsia de próstata como estándar representativo de CP, dada su baja sensibilidad⁵⁵⁻⁵⁸ y elevada tasa de falsos negativos^{56,60,161}. Por ello, se considera de gran interés y objeto de futuro análisis el estudio prospectivo de los niveles de ERO en plasma seminal de varones afectos de CP que la biopsia inicial no detectó, utilizando como patrón de referencia de CP la pieza de prostatectomía radical de los pacientes finalmente intervenidos. El papel de la RM prostática multiparamétrica podría ser prometedor para aumentar la sensibilidad de la biopsia inicial, dado que permite visualizar focos glandulares con mayor probabilidad de cáncer⁷⁵, aunque el tiempo y coste de la técnica limita su uso generalizado a corto y medio plazo⁵⁹.

Por otro lado, los obstáculos metodológicos en la cuantificación de ERO podrían abordarse de diferentes maneras: aumentando la potencia estadística del ensayo NBT en la detección de diferencias en los niveles de ERO entre los subgrupos de varones, empleando técnicas adicionales para medir y controlar el efecto de la maquinaria enzimática anti-oxidante, etc.

Tal y como apuntó Oberley⁸⁸ en sus investigaciones sobre radicales libres y CP, con el fin de mejorar la estabilidad de los eventos oxidativos podrían desarrollarse estudios de cuantificación de actividad oxidativa a nivel intracelular, del mismo modo que se emplea el ensayo NBT para medir niveles de ERO intraespermáticos en el estudio del varón infértil¹²⁵⁻¹²⁹. Las células utilizadas podrían ser las epiteliales obtenidas del líquido seminal tras masaje prostático, metodología similar a los ensayos con biomarcador PCA3^{159,146-148}. Ello, además, podría contribuir a resolver la dificultad de aislar la secreción prostática del resto de componentes del plasma seminal.

Conclusiones

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en esta Tesis doctoral, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. En el presente estudio no se ha hallado relación entre los niveles de estrés oxidativo o especies reactivas de oxígeno (ERO) en el plasma seminal y la presencia de cáncer de próstata (CP) en la biopsia prostática, por tanto, la determinación del estrés oxidativo en plasma seminal mediante la técnica del test NBT no ha podido considerarse como un biomarcador útil en el diagnóstico de este tipo de neoplasia.
2. No se ha evidenciado una relación significativa entre los niveles de ERO en el plasma seminal y la fracción de cilindros afectados en el grupo de varones con biopsia positiva, no pudiendo considerarse un factor predictor de mal pronóstico de CP en la muestra a estudio.
3. No se ha establecido correlación significativa entre los niveles de ERO en el plasma seminal y el grado Gleason en el grupo de varones con biopsia positiva, por tanto, no pudo considerarse como un biomarcador pronóstico útil en la muestra a estudio.
4. No se observaron diferencias en cuanto a los niveles de ERO en plasma seminal entre el grupo de varones de edad inferior a 60 años y el grupo de varones mayores de 60 años, de lo que se puede concluir que, en la muestra analizada, el nivel de estrés oxidativo seminal no se encuentra afectado por el factor "edad".

5. No se hallaron diferencias significativas en cuanto a los niveles de ERO en los varones con CP clínicamente detectable con respecto a los varones con tacto rectal no sospechoso. Por tanto, en la muestra estudiada, la determinación del estrés oxidativo en plasma seminal no contribuye a mejorar la sensibilidad de la prueba del tacto rectal en el sujeto con sospecha analítica de CP.

6. No se hallaron diferencias entre los niveles de ERO en plasma seminal y el volumen prostático. Por tanto, en la muestra analizada, el nivel de estrés oxidativo seminal no se encuentra afectado por el factor "volumen prostático".

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. 2010;46:765–81.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 63:11–30.
3. Globocan. Prostate cancer incidence and mortality worldwide in 2008 — summary. Available at <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/prostate.Asp>
4. INE datos 2010
5. Cayuela A, Lacalle JR, Gili M. Análisis of cohort mortality from prostatic cancer in Spain, 1951 – 1983. *J Epidemiol Commun Health*. 1989; 43: 249 – 252.
6. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. ERSPC Investigators. Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. *N Engl J Med*. 2012 Mar;366(11):981-90.
7. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*. 2006 May;24(14):2137-50.
8. Droz JP, Aapro M, Balducci L, et al. Management of prostate cancer in senior adults: updated recommendations of a working group of the International Society of Geriatric Oncology (SIOG). *Lancet Oncology*. 2014. Accepted for publication.
9. Berrino F, De Angelis R, Sant M, Rosso S, Lasota MB, Coebergh JW, et al. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995–99: results of the EURO CARE-4 study. *Lancet Oncol*. 2007; 8 (9): 773-783.
10. Okotie OT, Roehl KA, Han M, et al Characteristics of prostate cancer detected by digital rectal examination only. *Urology*. 2007 Dec;70(6):1117-20.
11. Gosselaar C, Roobol MJ, Roemeling S, et al. The role of the digital rectal examination in subsequent screening visits in the European randomized study of screening for prostate cancer (ERSPC), Rotterdam. *Eur Urol*. 2008 Sep;54(3):581-8.
12. Stamey TA, Yang N, Hay AR, et al. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med*. 1987 Oct;317(15):909-16.
13. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, 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*. 1994 May;151(5):1283-90.
14. Semjonow A, Brandt B, Oberpenning F, et al. Discordance of assay methods creates pitfalls for the interpretation of prostate-specific antigen values. *Prostate Suppl*. 1996;7:3-16.
15. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or = 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med*. 2004 May 27;350(22):2239-46.
16. Howrey B.T., Kuo Y.-F., Lin Y.-L., Goodwin J.S. The impact of PSA screening on prostate cancer mortality and overdiagnosis of prostate cancer in the United States. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2013;68:56–61

17. Tonry CL, Leacy E, Raso C, Finn SP, Armstrong J, Pennington SR. The Role of Proteomics in Biomarker Development for Improved Patient Diagnosis and Clinical Decision Making in Prostate Cancer. *Diagnostics (Basel)*. 2016 Jul 18;6(3).
18. Ilic, D., et al. Screening for prostate cancer. *Cochrane database Syst Rev*, 2013 Jan 31; (1): CD004720
19. Arnsrud Godtman R, Holmberg E, Lilja H, Stranne J, Hugosson J. Opportunistic testing versus organized prostate-specific antigen screening: outcome after 18 years in the Göteborg randomized population-based prostate cancer screening trial. *Eur Urol*. 2015 Sep;68(3):354-60.
20. Hayes JH, Barry MJ. Screening for prostate cancer with the prostate-specific antigen test: a review of current evidence. *JAMA*. 2014 Mar 19;311(11):1143-9.
21. Loeb S, Gonzalez CM, Roehl KA, Han M, Antenor JA, Yap RL. Pathological characteristics of prostate cancer detected through prostate specific antigen based screening. *J Urol*. 2006 Mar;175(3 Pt 1):902-6.
22. Gelfond J, Choate K, Ankerst DP, Hernandez J, Leach RJ, Thompson IM Jr. Intermediate-Term Risk of Prostate Cancer is Directly Related to Baseline Prostate Specific Antigen: Implications for Reducing the Burden of Prostate Specific Antigen Screening. *J Urol*. 2015 Jul;194(1):46-51
23. Lee R, Localio AR, Armstrong K, Malkowicz SB, Schwartz JS, Free PSA Study Group. A meta-analysis of the performance characteristics of the free prostate-specific antigen test. *Urology*. 2006;67(4):762
24. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicentre clinical trial. *JAMA*. 1998 May;279(19):1542-7.
25. Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*. 2003 Jan 15; 21(2):383-91.
26. Schmid H-P, McNeal JE, Stamey TA. Observations on the doubling time of prostate cancer. The use of serial prostate-specific antigen in patients with untreated disease as a measure of increasing cancer volume. *Cancer*. 1993 Mar;71(6):2031-40
27. Carter HB, Ketterman A, Ferruci L, Landis P, Meter EJ. Prostate-specific antigen velocity risk count assessment: a new concept for detection of life-threatening prostate cancer during window of curability. *Urology* 2007; 70:685-90.
28. Vickers AJ, Savage C, O'Brien MF, et al. Systematic review of pretreatment prostate-specific antigen velocity and doubling time as predictors for prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jan;27(3):398-403.
29. O'Brien MF, Cronin AM, et al. Pretreatment prostate-specific antigen (PSA) velocity and doubling time are associated with outcome but neither improves prediction of outcome beyond pretreatment PSA alone in patients treated with radical prostatectomy. *J Clin Oncol*. 2009 Aug;27(22):3591-7.
30. Ukimura O, Coleman JA, de la Taille A, Emberton M, Epstein JI, Freedland SJ, et al. Contemporary role of systematic prostate biopsies: indications, techniques, and implications for patient care. *Eur Urol*. 2013 Feb;63(2):214-30
31. Eastham JA, Riedel E, Scardino PT, Shike M, Fleisher M, Schatzkin A. Variation of serum prostate-specific antigen levels: an evaluation of year-to-year fluctuations. *JAMA*. 2003 May 28;289(20):2695-700.

32. Hara R, Jo Y, Fujii T, et al. Optimal approach for prostate cancer detection as initial biopsy: prospective randomized study comparing transperineal versus transrectal systematic 12-core biopsy. *Urology*. 2008 Feb;71(2):191-5.
33. Donovan J, Hamdy F, Neal D, et al. ProtecT Study Group. Prostate Testing for Cancer and Treatment (ProtecT) feasibility study. *Health Technol Assess* 2003;7(14):1-88.
34. Sonn GA, Chang E, Natarajan S, Margolis DJ, Macairan M, Lieu P. Value of targeted prostate biopsy using magnetic resonance-ultrasound fusion in men with prior negative biopsy and elevated prostate-specific antigen. *Eur Urol*. 2014 Apr;65(4):809-15.
35. Epstein JI, Herawi M. Prostate needle biopsies containing prostatic intraepithelial neoplasia or atypical foci suspicious for carcinoma: implications for patient care. *J Urol*. 2006 Mar; 175 (3 Pt 1):820-834.
36. Merrimen JL, Jones G, Walker D, et al. Multifocal high grade prostatic intraepithelial neoplasia is a significant risk factor for prostatic adenocarcinoma. *J Urol*. 2009 Aug;182(2):485-90.
37. Kronz JD, Shaikh AA, Epstein JI. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia with adjacent small atypical glands on prostate biopsy. *Hum Pathol*. 2001 Apr;32(4):389-95.
38. Guo CC, Epstein JI. Intraductal carcinoma of the prostate on needle biopsy: Histologic features and clinical significance. *Mod Pathol*. 2006 Dec;19(12):1528-35.
39. Sauter G, Steurer S, Clauditz TS, Krech T, Wittmer C, Lutz F, et al. Clinical Utility of Quantitative Gleason Grading in Prostate Biopsies and Prostatectomy Specimens. *Eur Urol*. 2016 Apr; 69(4):592-8.
40. Brimo F, Montironi R, Egevad L, Erbersdobler A, Lin DW, Nelson JB, et al. Contemporary grading for prostate cancer: implications for patient care. *Eur Urol*. 2013 May;63(5):892-901.
41. Van der Kwast T, Bubendorf L, Mazerolles C, et al. Guidelines on processing and reporting of prostate biopsies: the 2013 update of the pathology committee of the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC). *Virchows Arch*. 2013 Sep;463(3):367-77.
42. De Torres Ramírez I. Factores pronósticos y precitativos del carcinoma de próstata en la biopsia prostática. *Actas Urol Esp*. 2007;31(9):1025-1044
43. Leone A, Gershman B, Rotker K, Butler C, Fantasia J, Miller A, et al. Atypical small acinar proliferation (ASAP): is a repeat biopsy necessary? A multi-institutional review. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2016 Mar;19 (1):68-71.
44. Lawrence K. Altman. Donald F. Gleason, 88, Dies; Devised Prostate Test. *The New York Times*. 10 January 2009.
45. Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, et al. ISUP grading committee. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005 Sep; 29(9):1228-42.
46. Albertsen PC, Hanley JA, Gleason DF, Barry MJ. Competing risk analysis of men aged 55 to 74 years at diagnosis managed conservatively for clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 1998 Sep; 280 (11):975-80.
47. Albertsen P, Hanley JA, Murphy-Setzko M. Statistical considerations when assessing outcomes following treatment for prostate cancer. *J Urol*. 1999 Aug; 162(2):439-44.

48. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, et al. A contemporary prostate cancer grading system: A validated alternative to the Gleason score. *Eur Urol.* 2016 Mar; 69 (3): 428-35.
49. Stark JR, Perner S, Stampfer MJ, et al. Gleason score and lethal prostate cancer: does 3+4 = 4+3? *J Clin Oncol.* 2009; 27:3459-64.
50. Tsao CK, Gray KP, Nakabayashi M. et al. Patients with biopsy Gleason 9 and 10 prostate cancer have significantly worse outcomes compared with Gleason 8 disease. *J Urol.* 2015; 194:91-7.
51. Freedland SJ, Aronson WJ, Terris MK, Kane CJ, Amling CL, Dorey F et al. The percentage of prostate needle biopsy cores with carcinoma from the more involved of the biopsy as a predictor of prostate specific antigen recurrence after radical prostatectomy: results from the Shared Equal Access Regional Cancer Hospital (SEARCH) database. *Cancer.* 2003;98(11):2344-2350
52. Tigrani VS, Bhargava V, Shinohara K, Presti JC Jr. Number of positive systematic sextant biopsies predicts surgical margin status at radical prostatectomy. *Urology.* 1999; 54(4):689-693.
53. Freedland SJ, Csathy GS, Dorey F, Aronson WJ. Percent prostate needle biopsy tissue with cancer is more predictive of biochemical failure or adverse pathology after radical prostatectomy than prostate specific antigen or Gleason score. *J Urol.* 2002;167 (2 Pt 1):516-520.
54. Antunes AA, Srougi M, Dall'Oglio MF, Crippa A, Campagnari JC, Leite KR. The percentage of positive biopsy cores as a predictor of disease recurrence in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *BJU Int.* 2005; 96(9):1258-1263
55. Djavan B, Remzi M, Schulman C, Marberger M, Zlotta A. Repeat prostate biopsy: who, how and when? *Eur Urol.* 2002;42(2):93-103.
56. Amsellem-Ouazana D, Younes P, Conquy S, et al. Negative prostatic biopsies in patients with a high risk of prostate cancer. Is the combination of endorectal MRI and magnetic resonance spectroscopy imaging (MRSI) a useful tool? A preliminary study. *Eur. Urol.* 2005; 47: 582-6.
57. Anastasiadis AG, Lichy MP, Nagele U *et al.* MRI-guided biopsy of the prostate increases diagnostic performance in men with elevated or increasing PSA levels after previous negative TRUS biopsies. *Eur. Urol.* 2006; 50: 738-48.
58. Tei H, Miyake H, Hatada K, Fujisawa M. *Curr Urol.* Detection of significant prostate cancer according to anatomical areas of sampling cores obtained with transrectal systematic 12-core biopsy. 2015 Jul; 8 (2):91-95.
59. Català V, Salas D, Esquena S, Mateu S, Algaba F, Palou J, et al. Preguntas y respuestas sobre resonancia magnética multiparamétrica prostática: todo lo que el urólogo debe conocer. *Actas Urol Esp.* 2016; 40(6):339-352.
60. Eichler K, Hempel S, Wilby J, Myers L, Bachman L.M, Kleijnen J, Diagnostic value of systematic biopsy methods in the investigation of prostate cancer: A systematic review, *J Urology.* 2006; (175): 1605-1612.
61. R. Arora, M.O. Koch, J.N. Eble, T.M. Ulbright, L. Li and L. Cheng, Heterogeneity of Gleason grade in multifocal adenocarcinoma of the prostate. *Cancer.* 2004; 100; 2362-2366
62. Tonry CL, Leacy E, Raso C, Finn SP, Armstrong J, Pennington SR. The Role of Proteomics in Biomarker Development for Improved Patient Diagnosis and Clinical Decision Making in Prostate Cancer. *Diagnostics (Basel).* 2016 Jul 18;6(3).

63. Loeb S, Vellekoop A, Ahmed HU, et al. Systematic review of complications of prostate biopsy. *Eur Urol.* 2013 Dec;64(6):876-92.
64. Fossati N, Buffi NM, Haese A, et al. Preoperative prostate-specific antigen isoform p2PSA and its derivatives, %p2PSA and Prostate Health Index, predict pathologic outcomes in patients undergoing radical prostatectomy for prostate cancer: results from a multicentric European prospective study. *Eur Urol.* 2015 Jul;68 (1):132-8
65. Kanyong P, Rawlinson S, Davis J. Immunochemical Assays and Nucleic-Acid Detection Techniques for Clinical Diagnosis of Prostate Cancer. *J Cancer.* 2016 Feb 10;7(5):523-31.
66. Vickers AJ, Cronin AM, Roobol MJ, Savage CJ, Peltola M, Petterson K, et al. A four-kallicrein panel predicts prostate cancer in men with recent screening: data from the European Randomized Study of Screening for prostate cancer, Rotterdam. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3232-9.
67. Stattin P, Vickers AJ, Sjoberg DD, Johansson R, Granfors T, Johansson M, et al. Improving the Specificity of Screening for Lethal Prostate Cancer Using Prostate-specific Antigen and a Panel of Kallikrein Markers: A Nested Case-Control Study. *Eur Urol.* 2015 Aug;68(2):207-13.
68. Deras IL, Aubin SM, Blase A, et al. PCA3: a molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome. *J Urol.* 2008 Apr;179(4):1587-92.
69. Hessels D, van Gils MP, van Hooij O, et al. Predictive value of PCA3 in urinary sediments in determining clinico-pathological characteristics of prostate cancer. *Prostate.* 2010 Jan;70(1):10-6.
70. Auپرچ M, Bjartell A, Chun FK, et al. Contemporary role of prostate cancer antigen3 in the management of prostate cancer. *Eur Urol.* 2011 Nov;60(5):1045-54
71. Barrett T, Turkbey B, Choyke PL. PI-RADS version 2: what you need to know. *Clin Radiol.* 2015;70:1165-76.
72. Fütterer JJ, Briganti A, De Visschere P, Emberton M, Giannarini G, Kirkham A, et al. Can Clinically Significant Prostate Cancer Be Detected with Multiparametric Magnetic Resonance Imaging? A Systematic Review of the Literature. *Eur Urol.* 2015;68:1045-53.
73. Barentsz JO, Richenberg J, Clements R, Choyke P, Verma S, Villeirs G, et al. *Eur Radiol* 2012;22(4):746-57.
74. Moore CM, Robertson NL, Arsanious N, Middleton T, Villers A, Klotz L, et al. Image-guided prostate biopsy using magnetic resonance imaging-derived targets: A systematic review. *Eur Urol.* 2013;63:125-40.
75. Mozer P, Rouprêt M, le Cossec C, Granger B, Comperat E, de Gorski A, et al. First round of targeted biopsies using magnetic resonance imaging/ultrasonography fusion compared with conventional transrectal ultrasonography-guided biopsies for the diagnosis of localised prostate cancer. *BJU Int.* 2015;115: 50-7.
76. Mullins JK, Bonekamp D, Landis P, Begum H, Partin AW, Epstein JI, et al. Multiparametric magnetic resonance imaging findings in men with low-risk prostate cancer followed using active surveillance. *BJU Int.* 2013;111:1037-45.
77. Lista F, Castillo E, Gimbernat H, Rodríguez-Barbero JM, Panizo J, Angulo JC. Multiparametric magnetic resonance imaging predicts the presence of prostate cancer in patients with negative prostate biopsy. *Actas Urol Esp.* 2015;39:85-91.

78. Sobin LH, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. UICC International Against Cancer. 7th edn. 2009.
79. Pospihalj B. Staging of prostate cancer: a review with reference for further refinement. *Anal Quant Cytopathol.* 2015 Feb; 37(1):69-74.
80. Cheng L, Montironi R, Bostwick DG, Lopez-Beltran A, Berney DM. Staging of prostate cancer. *Histopathology.* 2012 Jan;60(1):87-117.
81. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, et al. The combination of preoperative prostate specific antigen and postoperative pathological findings to predict prostate specific antigen outcome in clinically localized prostate cancer. *J Urol.* 1998;160:2096–101
82. Ishizaki F, Hoque MA, Nishiyama T, Kawasaki T, Kasahara T, Hara N, et al. External validation of the UCSF-CAPRA (University of California, San Francisco, Cancer of the Prostate Risk Assessment) in Japanese patients receiving radical prostatectomy. *Jpn J Clin Oncol.* 2011 Nov;41(11):1259-64.
83. Gnanapragasam VJ, Lophatananon A, Wright KA, Muir KR, Gavin A, Greenberg DC. Improving Clinical Risk Stratification at Diagnosis in Primary Prostate Cancer: A Prognostic Modelling Study. *PLoS Med.* 2016 Aug 2;13(8)
84. Paschos A, Pandya R, Duivenvoorden WC, Pinthus JH. Oxidative stress in prostate cancer: changing research concepts towards a novel paradigm for prevention and therapeutics. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2013 Sep;16(3):217-25
85. Svidzinsky AA, Scully MO, Herschbach DR. Bohr's 1913 molecular model revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 23;102(34):11985-8.
86. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009; 417: 1–13.
87. Bostwick DG, Alexander EE, Singh R, Shan A, Qian J, Santella RM et al. Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer.* 2000; 89: 123–134
88. Oberley TD, Zhong W, Szweda LI, Oberley LW. Localization of antioxidant enzymes and oxidative damage products in normal and malignant prostate epithelium. *Prostate.* 2000; 44: 144–155.
89. Frohlich DA, McCabe MT, Arnold RS, Day ML. The role of Nrf2 in increased reactive oxygen species and DNA damage in prostate tumorigenesis. *Oncogene.* 2008; 27: 4353–4362.
90. Bohr, V.A. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 32, 804–812.
91. Donkena KV, Young CY, Tindall DJ. Oxidative stress and DNA methylation in prostate cancer. *Obstet Gynecol Int.* 2010; 2010: 302051.
92. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10: 1343–1374.
93. Fernandez PL, Farre X, Nadal A, Fernandez E, Peiro N, Sloane BF et al. Expression of cathepsins B and S in the progression of prostate carcinoma. *Int J Cancer.* 2001; 95: 51–55.
94. Nguyen HL, Zucker S, Zarrabi K, Kadam P, Schmidt C, Cao J. Oxidative stress and prostate cancer progression are elicited by membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Mol Cancer Res.* 2011 Oct;9(10):1305-18.

95. Lin X, Asgari K, Putzi MJ, Gage WR, Yu X, Cornblatt BS et al. Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide. *Cancer Res.* 2001; 61: 8611–8616.
96. Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 2003; 552, 335–344.
97. Balaban R.S, et al. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005; 120, 483–495.
98. Ishikawa K, et al. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science.* 2008; 320, 661–664.
99. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002; 420: 860–867.
100. Klein EA, Casey G, Silverman R. Genetic susceptibility and oxidative stress in prostate cancer: integrated model with implications for prevention. *Urology.* 2006; 68: 1145–1151.
101. Anson B. J, McVay CH. *Surgical Anatomy.* 1971. 6ª Ed. Vol. II. Philadelphia: W.B. Saunders Co.
102. Mc Neal J.E. Zonal prostate anatomy. *Am J Surg Pathol.* 1988; 12: 629-633.
103. Gil-Vernet JM. Prostate cancer: anatomical and surgical considerations. *Br J Urol.* 1996 Aug;78(2):161-8.
104. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007 Apr;7(4):256-69
105. Cruz N. *Tratado de Andrología y Medicina Sexual.* Tomo 1. 1ª Ed. Editorial Médica Panamericana, 2011.
106. Schiffer S.H. , Biomarkers for Prostate Cancer. *World J Urol.* 2007; 25: 557–562.
107. Cazares LH, Drake RR, Esquela-Kirscher A, Lance RS, Semmes OJ, Troyer DA. Molecular pathology of prostate cancer. *Cancer Biomark.* 2010; 9: 441–459.
108. Neuhaus J, Schiffer E, von Wilcke P, Bauer HW, Leung H, Siwy J, et al. Seminal plasma as a source of prostate cancer peptide biomarker candidates for detection of indolent and advanced disease *PLoS One.* 2013 Jun 24;8(6).
109. Chuang TD, Chen SJ, Lin FF, Veeramani S, Kumar S, et al. Human prostatic acid phosphatase, an authentic tyrosine phosphatase, dephosphorylates ErbB-2 and regulates prostate cancer cell growth. *J Biol Chem.* 2010; 285: 23598–23606.
110. Schiffer E, Bick C, Grizelj B, Pietzker S, Schofer W. Urinary proteome analysis for prostate cancer diagnosis: cost-effective application in routine clinical practice in Germany. *Int J Urol.* 2012; 19: 118–125
111. Aitken RJ, West K, Buckingham D. Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. *J Androl.* 1994 Jul-Aug;15(4):343-52.
112. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril.* 1995 Jun;63(6):1143-57.
113. Ronquist G, Nilsson BO. The Janus-faced nature of prostasomes: their pluripotency favours the normal reproductive process and malignant prostate growth. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2004;7:21–31.

114. Tappel A. Lysosomal and prostatic hydrolytic enzymes and redox processes and initiation of prostate cancer. *Med Hypotheses*. 2005; 64(6): 1170-2.
115. Tappel AL. Lysosomal enzymes and other components. In: Dingle JT, Fell HB, editors. *Lysosomes in biology and pathology*. London: North-Holland; 1969. p. 207–44.
116. Garrido N, Meseguer M, Alvarez J, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 2004 Oct;82 Suppl 3:1059-66.
117. Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol*. 2004 Mar 15;216(1-2):31-9.
118. Athayde KS, Cocuzza M, Agarwal A, Krajcir N, Lucon AM, Srougi M. et al. Development of normal reference values for seminal reactive oxygen species and their correlation with leukocytes and semen parameters in a fertile population. *J Androl*. 2007 Jul-Aug;28(4):613-20.
119. Kobayashi H, Gil-Guzman E, Mahran AM, Rakesh, Nelson DR, Thomas AJ Jr, et al. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. *J Androl*. 2001 Jul-Aug;22(4):568-74.
120. Czaplicki S. *Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds*. Electrical and Electronic Engineering "Column Chromatography". Capítulo 4. Editado por Dean F. Martin y Barbara B. Martin, ISBN 978-953-51-1074-3. Publicado en Abril de 2013.
121. Tavilani H, Doosti M, Saeidi H. Malondialdehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters. *Clin Chim Acta*. 2005 Jun;356(1-2):199-203.
122. Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TI, Liao TL, Wei YH. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil Steril*. 2008 May;89(5):1183-90.
123. Liochev SI, Fridovich I. Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys*. 1997 Jan 1;337(1):115-20.
124. Trinh le A et al. Fluorescent in situ hybridization employing the conventional NBT/BCIP chromogenic stain. *BioTechniques*. June 2007; 42 (6): 756–9.
125. Baehner RL, Boxer LA, Davis J. The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. *Blood*. 1976 Aug;48(2):309-13.
126. Choi HS, Kim JW, Cha YN, Kim C. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem*. 2006;27(1):31-44.
127. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. *Human Reproduction*. 2008; 14(3): 243–58.
128. López G, Lafuente R, Ribas J, Lozano. I, Benet J, García-Peiró A. El stress oxidativo en muestras de semen en pacientes infértiles medido con el kit Oxisperm es independiente de los parámetros seminales y la edad. Congreso Nacional Sociedad Española de Fertilidad 2014.

129. Lafuente R, López G, Ribas J, Lozano I, Benet J, García-Peiró A. La presencia de espermatozoides con cromatina inmadura determinados mediante SCSA se relaciona con la presencia del ion superóxido. Congreso Nacional Sociedad Española de Fertilidad 2014.
130. Mercado-Pichardo E, Vilar-Rojas C, Wens-Flores MD, Bernal-Torres A. Reduction capacity on nitroblue tetrazolium (NBT) of the normal human spermatozoa. Arch Invest Med (Mex). 1981;12(1):107-14.
131. Tunc O, Thompson J, Tremellen K. Development of the NBT assay as a marker of sperm oxidative stress. Int J Androl. 2010 Feb;33(1):13-21.
132. Esfandiari N, Sharma RK, Saleh RA, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. J Androl. 2003 Nov-Dec;24(6):862-70.
133. Littrup PJ, Williams CR, Egglin Tk, Kane RA. Determination of prostate volume with transrectal US for cancer screening. Part II. Accuracy of in vitro and in vivo techniques. Radiology 1991;179(1):49-53.
134. Dall'Era MA, Konety BR, Cowan JE, Shinohara K, Stauf F, Cooperberg MR, et al. Active surveillance for the management of prostate cancer in a contemporary cohort. Cancer. 2008 Jun 15;112(12):2664-70.
135. Bianco FJ Jr, Scardino PT, Eastham JA. Radical prostatectomy: long-term cancer control and recovery of sexual and urinary function ("trifecta"). Urology. 2005 Nov;66(5Suppl):83-94.
136. Pollack a, Zagars GK, Starkchall G. Prostate cancer radiations dose response: Results of the MD Anderson phase III randomized trial. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2002; 53:1097
137. Sólétormos G, Semjonow A, Sibley P.E, Lamerz R, Petersen P.H, Albretch W, et al. Biological variation of total prostate-specific antigen: a survey of published estimates and consequences of clinical practice. Clin Chem. 2005; 51:1342-1351.
138. Fujita K, Landis P, McNeil B.K, Pavlovich C.P. Serial prostate biopsies are associated with and increased risk of erectile dysfunction in men with prostate cancer on active surveillance. J Urol. 2009;182:1664-69.
139. Gardiner RA, Samaratunga ML, Gwynne RA, Clague A, Seymour GJ, Lavin MF. Abnormal prostatic cells in ejaculates from men with prostatic cancer—a preliminary report. Br J Urol. 1996; 78(3):414–418.
140. Barren RJ, Holmes EH, Boynton AL, Gregorakis A, Elgamal AA, Cobb OE, et al. Method for identifying prostate cells in semen using flow cytometry. Prostate. 1998; 36(3):181–188.
141. Obiezu Cv, Shan SJ, Soosaipillai A, Luo LY, Sotiropoulou G, Petraki CD, et al. Human kallikrein 4: quantitative study in tissues and evidence for its secretion into biological fluids. Clin Chem. 2005; 51:1432-42.
142. Acevedo B, Perera Y, Torres E, Penton D, Ayala M, Gavilondo J. Fast and novel purification method to obtain the prostate-specific antigen (PSA) from human seminal plasma. Prostate. 2006;66:1029-36.
143. Dijkstra S, Mulders PF, Schalken JA. Clinical use of novel urine and blood based prostate cancer biomarkers: a review. Clin Biochem. 2014 Jul;47(10-11):889-96

144. Iwakiri J, Granbois K, Wehner N, Graves HC, Stamey T. An analysis of urinary prostate specific antigen before and after radical prostatectomy: evidence for secretion of prostate specific antigen by the periurethral glands. *J Urol* 1993;149(4):783–6.
145. Clements JA, Rohde P, Allen V, Hyland VJ, Samaratunga ML, Tilley WD, et al. Molecular detection of prostate cells in ejaculate and urethral washings in men with suspected prostate cancer. *J Urol* 1999;161(4):1337–43.
146. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, et al. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol*. 2003 Jul;44(1):8-15; discussion 15-6.
147. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69:89–95.
148. Rigau M, Oliván M, Planas J, De Torres I, Morote J, Reventós J, et al. The Present and Future of Prostate Cancer Urine Biomarkers. *Int. J. Mol. Sci*. 2013, 14, 12620-12649.
149. Gacci M, Ficarra V, Sebastianelli A, Corona G, Serni S, Shariat SF, et al. Impact of medical treatments for male lower urinary tract symptoms due to benign prostatic hyperplasia on ejaculatory function: a systematic review and meta-analysis. *J Sex Med*. 2014 Jun;11(6):1554-66.
150. Walz J, Graefen M, Chun FK, et al. High incidence of prostate cancer detected by saturation biopsy after previous negative biopsy series. *Eur Urol*. 2006 Sep;50(3):498-505.
151. Ornstein DK, Smith DS, Humphrey PA, Catalona WJ. The effect of prostate volume, age, total prostate specific antigen level and acute inflammation on the percentage of free serum prostate specific antigen levels in men without clinically detectable prostate cancer. *J Urol*. 1998 Apr; 159(4):1234-7.
152. Habermacher GM, Chason JT, Schaeffer AJ. Prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Ann Rev Med* 2006; 57: 195-206.
153. Battisti V, Maders LD, Bagatini MD, Reetz LG, Chiesa J, Battisti IE, et al. Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients: relation to Gleason score, treatment and bone metastasis. *Biomed Pharmacother*. 2011 Oct;65(7):516-24.
154. Hoque A, Ambrosone CB, Till C, Goodman PJ, Tangen C, Kristal A et al. Serum oxidized protein and prostate cancer risk within the Prostate Cancer Prevention Trial. *Cancer Prev Res. (Philadelphia)* 2010; 3: 478–483.
155. Walczak-Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska-Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Cent European J Urol*. 2013;66(1):60-7.
156. Plante M, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril*. 1994 Aug;62(2):387-93.
157. De Grey AD. The plasma membrane redox system: a candidate source of aging-related oxidative stress. *Age (Dordr)*. 2005 Jun; 27 (2):129-38.
158. Ronquist G, Brody I, Gottfries A, Stegmayr B. An Mg²⁺ and Ca²⁺ -stimulated adenosine triphosphatase in human prostatic fluid. Part I and Part II. *Andrologia* 1978; 10: 261–272. and 427–431.

- 159.Theodorescu D, Schiffer E, Bauer HW, Douwes F, Eichhorn F, et al. Discovery and validation of urinary biomarkers for prostate cancer. *Proteomics Clin Appl*. 2008; 2: 556–570.
- 160.Haas GP, Delongchamps NB, Jones RF, Chandan V, Serio AM, Vickers AJ, et al. Needlebiopsies on autopsy prostates: sensitivity of cancer detection based on true prevalence. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Oct 3;99(19):1484-9.
- 161.Fumadó, LI; Ubré A; Juanpere, N; Lorente, JA.; Francés, A.; Arango, O. Cáncer de próstata clínicamente significativo en lóbulo contralateral de pacientes con tumor unilateral en biopsia extendida: implicaciones para terapia focal. LXXIX Congreso Nacional de Urología. Costa Adeje (Tenerife), 2014.
- 162.Serefoglu EC, Altinova S, Ugras NS, Akincioglu E, Asil E, Balbay MD. How reliable is 12-core prostate biopsy procedure in the detection of prostate cancer? *Can Urol Assoc J*. 2013 May-Jun;7(5-6):E293-8.
- 163.Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 1992; 57: 409–416.
- 164.Aitken RJ, West K, Buckingham D. Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. *J Androl*. 1994 Jul-Aug;15(4):343-52.
- 165.Krausz C, West K, Buckingham D, Aitken RJ. Development of a technique for monitoring the contamination of human semen samples with leukocytes. *Fertil Steril*. 1992 Jun;57(6):1317-25.
- 166.Singh SV, Choi S, Zeng Y, Haim ER, Xiao D. Guggulsterone-induced apoptosis in human prostate cancer cells is caused by reactive oxygen intermediate dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Res*. 2007; 67:7439-49.
- 167.Shukla S, Gupta S. Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. *Free Radic Biol Med*. 2008;44:1833-45.
- 168.Afanas'ev I. Recative oxygen species signaling in cancer: comparison with aging. *Aging Dis*. 2011 Jun;2(3):219-30.
- 169.Alibhai SM, Krahn MD, Fleshner NE, Cohen MM, Tomlinson GA, Nalglie G. The association between patient age and prostate cancer stage and grade at diagnosis. *BJU Int*. 2004 Aug; 94(3):303-6.
- 170.Uzzo RG, Wei JT, Waldbaum RS, Perlmutter AP, Byrne JC, Vaughan ED Jr. The influence of prostate size on cancer detection. *Urology*. 1995;46:831–836.
- 171.Remzi M, Djavan B, Wammack R, Momeni M, Seitz C, Erne B, et al. Can total and transition zone volume of the prostate determine whether to perform a repeat biopsy?. *Urology*. 2003 Jan; 61 (1):161-6
- 172.Mori K, Shibnuma M, Nose K. Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 2004; 64:7464–72.
- 173.Bianchi-Frias D, Vakar-López F, Coleman IM, Plymate SR, Reed MJ, Nelson PS. The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. *PLoS One*. 2010 Sep 1;5 (9).pii: e12501
- 174.Mainard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis*. 2009 Jan; 30 (1):2-10.

175. Aryal M, Pandeya A, Bas B.K, Lamsa M, Majhi S, Pandit R, et al. Oxidative stress in patients with benign prostate hyperplasia. *J Nepal Assoc.* 2007;46:103-106
176. Minciullo PL, Inferrera A, Navarra M, Calapai G, Magno C, Gangemi S. Oxidative stress in benign hyperplasia; a systematic review. *Urol Int.* 2015; 94 (3): 249-54

Anexos

ANEXOS

ANEXO I. Límites de referencia para las características del líquido seminal.

Fuente: WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5ª Ed. World Health Organization, 2010.

Parámetro		Límite de referencia inferior
Volumen seminal		> 1,5 mL
Nº total de espermatozoides		> 39 millones / eyaculado
Concentración de espermatozoides		15 millones / mL
Movilidad	Progresiva rápida (a+b)	> 32%
	Cualquier tipo (a+b+c)	> 40%
	Inmóviles	< 22%
Vitalidad (espermatozoides vivos)		> 58%
Morfología		≥ 4% normales
Otros valores umbral de consenso		
pH		≥ 7,2
Aglutinación		1 - 4
Leucocitos positivos para peroxidasa		< 1 millón / mL
Test MAR* (espermatozoides móviles con partículas adheridas)		< 50%
Inmonobead test (espermatozoides móviles con microcuentas adheridas)		< 50%
Zinc		> 2,4 µmol / eyaculado
Fructosa		> 13 µmol / eyaculado
Citratos		≤ 50 µmol / eyaculado
α-glucosidasa		≥ 20 µmol / eyaculado

*MAR = Reacción mixta de antiglobulinas

ANEXO II. Certificado Obtención Beca CIR e Informe del Comité Ético de Investigación Clínica





INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Coloma Moreno Quiroga, secretaria técnica del Comité Ético de Investigación Clínica de la Corporació Sanitària Parc Taulí,

HAGO CONSTAR:

Que el proyecto titulado **“Determinación del stress oxidativo en plasma seminal como parámetro diagnóstico en pacientes con cáncer de próstata”**, en el que consta Miriam Barrio Muñoz, como investigadora principal del proyecto, cumple con los requisitos metodológicos, éticos y legales necesarios para ser llevado a cabo.

Que este proyecto será presentado a la Convocatoria de Ayudas Merck Serono de Investigación 2014.

Que el proyecto mencionado quedará sujeto a las normas de seguimiento que tiene establecidas el Comité Ético de Investigación Clínica de este centro.

Que la Oficina de Investigación de la CSPT expresa su total disposición a dar cuantas facilidades estén a su alcance para el mejor desarrollo del estudio, en el caso de que éste pueda llevarse a cabo.

A handwritten signature in blue ink is written over a rectangular official stamp. The stamp contains the following text: 'Fundació Parc Taulí Institut Universitari UAB', 'Parc Taulí, 1 08208 Sabadell Barcelona (Spain)', and the UAB logo.

Coloma Moreno

Sabadell, 28 d'octubre de 2013



INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Doña COLOMA MORENO QUIROGA, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de la CORPORACIÓ SANITÀRIA PARC TAULÍ DE SABADELL (Barcelona)

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor BECA CIR código CIR2012/029 para que se realice el estudio titulado: "Determinación del stress oxidativo en plasma seminal como parámetro diagnóstico en pacientes con cáncer de próstata" del protocolo y considera que:

1. Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsible para el sujeto.
2. La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
3. Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudiera derivarse de su participación en el estudio.
4. El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
5. Y que el Comité acepta que dicho estudio sea realizado en el Corporació Sanitària Parc Taulí de SABADELL por BARRIO MUÑOZ MIRIAM y ABAD GAIRÍN CARLOS, como investigadores principales.

Lo que firma en SABADELL a martes, 26 marzo 2013

Firmado:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Coloma Moreno Quiroga'.

Dra. Coloma Moreno Quiroga

Ref.: 2013533

ANEXO III. Hoja Informativa y de Hoja de Consentimiento Informado

a) Hoja de información al paciente

TÍTULO DEL ESTUDIO: Determinación del estrés oxidativo en plasma seminal como parámetro diagnóstico en pacientes con cáncer de próstata.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Miriam Barrio Muñoz, Servicio Urología. Telf. Contacto 93 93 723 10 10

CENTRO: Corporación Sanitaria Parc Taulí. Hospital de Sabadell.

INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente y la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, de acuerdo a la legislación vigente, *el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos.*

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Este estudio consiste en el análisis de un determinado parámetro bioquímico (estrés oxidativo) en el semen de las personas candidatas a una biopsia prostática indicada por el Urólogo.

El objetivo principal de este estudio es conocer si existe relación entre este parámetro y la presencia de cáncer de próstata en la biopsia.

A largo plazo se desea obtener una información que, complementando a las pruebas actuales, permita mejorar la selección del sujeto candidato a biopsia y con ello evitar biopsias innecesarias.

La persona candidata a la biopsia de próstata únicamente deberá aportar una muestra de semen obtenida por masturbación de 1 a 7 días antes de la biopsia.

Instrucciones de obtención y entrega de la muestra:

- Se depositará en un recipiente facilitado por el Urólogo en la consulta.
- La obtención de la muestra deberá realizarse una hora antes de su entrega en el edificio UDIAT (en el mostrador “Entrega de muestras”). El horario de entrega de muestras es: los lunes de 8 a 10 de la mañana.
- Se entregará identificada junto a una hoja de solicitud de análisis de la muestra facilitada por el Urólogo en la consulta.

El participante no tendrá que entregar más muestras ni someterse a ninguna otra prueba añadida al proceso diagnóstico habitual llevado a cabo por el Urólogo.

Los resultados obtenidos serán confidenciales y si el voluntario lo desea podrán serle comunicados.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Es posible que el sujeto sometido al estudio no obtenga ningún beneficio para su salud por participar en este estudio, no obstante, el objetivo del estudio es beneficiar a largo plazo a futuros sujetos en la misma situación que los voluntarios actuales.

No existen riesgos ni efectos adversos asociados para el participante, ya que, el análisis de la muestra no implicará la realización de pruebas sobreañadidas al proceso diagnóstico habitual indicado por el Urólogo.

El médico responsable del estudio le dará más información si el participante lo desea.

CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo su médico del estudio/colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna excepto en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

COMPENSACIÓN ECONÓMICA

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo. Para la realización del estudio el promotor del mismo ha firmado un contrato con el centro donde se va a realizar y con el médico del estudio.

Su participación en el estudio sólo le supondrá el traslado a nuestro centro el día de la entrega de la muestra y no le comportará un aumento en el número de visitas con el Urólogo ni con otros profesionales médicos. La participación en este estudio será voluntaria y no compensada económicamente.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Cualquier nueva información que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, que se descubra durante su participación, le será comunicada por su médico lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del estudio lo consideran oportuno. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

b) Hoja de Consentimiento Informado para el paciente

Código y/o título del estudio: **Determinación del estrés oxidativo en plasma seminal como parámetro diagnóstico en pacientes con cáncer de próstata.**

Yo, (nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con Dra. Miriam Barrio Muñoz

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera.
2. Sin tener que dar explicaciones.
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información

Firma del paciente

Firma del Investigador

Nombre
Fecha

Nombre
Fecha

ANEXO IV. Publicaciones científicas.

Artículo publicado en European Journal of Cancer Prevention.

"Diagnosis of prostate cancer by analyzing oxidative stress in human seminal plasma: developing unsophisticated tools for noninvasive prostate cancer diagnosis."

Diagnosis of prostate cancer by analyzing oxidative stress in human seminal plasma: developing unsophisticated tools for noninvasive prostate cancer diagnosis

Barrio-Muñoz Miriam^a, Abad-Gairín Carlos^b, Amengual-Guedán M. José^c and Prats-López Joan^c

Prostate-specific antigen blood testing has improved early detection of prostate cancer (PCa); however, PCa mortality has not decreased accordingly and a prostate biopsy is still required for a definitive diagnosis. Proteomic biomarker screening in easily available body fluids such as seminal plasma is now increasingly being proposed as a solution to improve PCa detection and prognosis. PCa cells typically produce high levels of reactive oxygen species (ROS). In this study, we therefore investigated ROS levels in semen samples from patients with a negative or a positive prostate biopsy to predict PCa diagnosis. Multiple clinicopathological parameters (digital rectal examination, prostate-specific antigen scoring, prostate biopsy, and ROS levels) of patients examined for PCa were measured. No significant differences in ROS levels were detected in relation to PCa diagnosis. Although seminal plasma is a well-suited medium for prostate-related biomarkers, no significant

differences in ROS levels were observed between the patient groups. Comparison with ROS levels encountered in semen of larger patient groups is the next logical step. *European Journal of Cancer Prevention* 00:000-000 Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

European Journal of Cancer Prevention 2015, 00:000-000

Keywords: oxidative stress, prostate cancer, reactive oxygen species, seminal plasma

^aUrology Department, Hospital Povisa, Vigo, ^bUrology Department and ^cLaboratory Department, Parc-Tauli University Hospital, Sabadell, Spain

Correspondence to: Barrio-Muñoz Miriam, MD, Urology Department, POVISA Hospital, C/ Gran Vía, 42. 1º, Pontevedra, Vigo 36203, Spain
Tel: +34 676 958121; e-mail: mbarrio@povisa.es

Received 10 June 2015 Accepted 5 November 2015

Introduction

Prostate cancer (PCa) is globally the second most frequently diagnosed cancer in men (Jemal *et al.*, 2011). Estimates of PCa for 2014 indicate 233 000 new cases and over 29 000 deaths in the USA alone (Siegel *et al.*, 2014). PCa screening has increased markedly over the last decades, in large part because of the development of the prostate-specific antigen (PSA) blood test. Although PSA testing improved early detection of PCa (Miller *et al.*, 2003; Schröder *et al.*, 2012), no significant improvement in PCa mortality emerged from it (Ilic *et al.*, 2013). Elevated PSA levels are also found in benign prostatic hypertrophy, acute and chronic prostatitis, and other nonmalignant conditions, confounding accurate PCa diagnosis (Nadler *et al.*, 1995; Loeb *et al.*, 2009). As a result, overdiagnosis of low-risk PCa increases up to 60% (Welch and Black, 2010), which poses a serious risk of overtreatment and associated side effects such as urinary incontinence and sexual impotence.

The two other main screening methods consist of digital rectal examination (DRE) and transrectal ultrasonography. DRE is limited to the detection of palpable tumors, and transrectal ultrasonography has good sensitivity but lacks specificity (Pinto *et al.*, 2011; Felgueiras *et al.*, 2014). To establish a definitive diagnosis, a prostate

biopsy is therefore always required (Ukimura *et al.*, 2013). More recently, active surveillance of patients and identification of new biomarkers are proposed measures to stratify PCa severity and to predict disease progression (Bul *et al.*, 2013; Felgueiras *et al.*, 2014). This is of major importance as PCa remains fairly asymptomatic until reaching an advanced stage with metastatic potential (Bubendorf *et al.*, 2000). These metastases primarily affect bone, lung, and liver tissues, and are the main cause of PCa mortality (Arya *et al.*, 2006). Complementing current screening methods with proteomic biomarker screening, preferably in body fluids, is proposed to improve PCa detection and prognosis (Fredolini *et al.*, 2010; You *et al.*, 2010; Felgueiras *et al.*, 2014). One example is the proteome analysis of first-stream urine by capillary electrophoresis mass spectrometry, which shows 90% sensitivity and 61% specificity for PCa detection (Theodorescu *et al.*, 2008; Schiffer *et al.*, 2012). Although sampling body fluids proximal to the prostate gland is important, urine has the disadvantages of containing low concentrations of proteins (especially larger than 750 Da) and high salt concentrations (Norden *et al.*, 2004). By applying the same approach to seminal plasma, 2000 different seminal peptides were identified, and PCa diagnosis showed 83% sensitivity and 67% specificity (Neuhaus *et al.*, 2013).

0959-8278 Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

DOI: 10.1097/CJ0000000000000215

Another hallmark of PCa is oxidative stress. Compared with normal prostate cells, PCa cells produce higher levels of reactive oxygen species (ROS), in particular when showing a metastatic phenotype (Kumar *et al.*, 2008; Battisti *et al.*, 2011). These authors recommend that the oxidative profile of PCa patients should be closely monitored. The aim of this study was thus to measure ROS levels in seminal plasma of patients examined for PCa as an additional and precise method to predict PCa diagnosis.

Materials and methods

Patient selection

The study included initially a total of 79 men between 45 and 75 years of age. Because of the multicentric nature of the study, some participants only underwent a part of the comprehensive battery of tests for PCa examination. Therefore, 36 incomplete data sets were excluded from the study. Complete clinicopathological parameters were available from patients between 45 and 75 years old (mean 61.24 ± 7.27). Written informed consent was obtained from all patients. Clinical exclusion criteria were as follows: patients older than 75 years, patients with anejaculation, and/or patients who had undergone a previous prostate biopsy.

Physical examination

The clinical and laboratory data collected in the consultation were age, total PSA, free/total PSA ratio, and DRE.

Two types of consistency are defined for describing the DRE: adenomatous or suspicious of malignancy or suspicious nodular prostate and prostate neoplasia.

Prostate biopsy

Biopsies were taken by a trained physician following the hospital's guidelines. The technique was performed using a transrectal ultrasound probe [Toshiba Aplio 500, UMI (Ultrasound Expertise and Solutions, Delivered), San Jose, California, USA] and an 18 G needle after infiltration of 5 ml of local anesthetic (2% lidocaine) to each side of the periprostatic area. An ultrasound measurement of prostate volume was performed. The volume of the prostate was calculated using the standard ellipsoid formula: width \times height \times length $\times \pi/6$. Ten-core needle biopsies were performed, five cores each including the mid-peripheral zone and the lateral peripheral zone, and were sent separately in formalin for subsequent histological study.

ROS determination in seminal plasma

Patients provided a semen sample after 3 days of sexual abstinence. Fresh ejaculate was allowed to liquefy and a small amount of sample was reserved for the determination of sperm parameters (i.e. seminogram). The remaining sample was centrifuged for 10 min to remove

the sperm cells. Seminal plasma was then analyzed using the nitro blue tetrazolium (NBT) assay as described by Baehner *et al.* (1976). Briefly, 100 μ l of seminal plasma was incubated with an equal volume of NBT working reagent (1:10 diluted by PBS from 0.01% NBT stock; Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) at 37°C for 45 min. Following incubation, the samples were washed and centrifuged at 500g for 10 min in PBS twice to remove all residual NBT solution. The resulting color reaction was measured spectrophotometrically on a microplate reader at 530 nm.

Statistical analysis

Data analysis was carried out using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA). Clinicopathological parameters were compared using the nonparametric Kruskal-Wallis test. The level of significance was established at 95% of the confidence interval to be considered statistically significant. When *P* was less than 0.05, Dunn's multiple comparison test was performed to compare pairwise conditions.

Results

Correlation of ROS levels with biopsy diagnosis

All clinicopathological parameters of patients examined for PCa are shown in Table 1. PCa grading by the Gleason score is based on the observed architecture of the prostate biopsies under the microscope (Epstein *et al.*, 2005). We started our analysis by subdividing our patients into a group with a negative biopsies (both left and right sides free of PCa) and a group with positive biopsies (left or right side with PCa detected). The comparisons of all relevant factors between the negative group and the positive group are shown in Table 2. No significant differences in ROS levels (or other factors) were observed between both groups.

Correlation of ROS levels with age

Age is the most determining factor for PCa severity (Felgueiras *et al.*, 2014); therefore, our patient group was subdivided into a 'Junior' group and a 'Senior' group. The cutoff value was 60 years. The comparisons of all relevant factors between the Junior group and the Senior group are shown in Table 3. No significant differences in ROS levels (or other factors) were, however, observed between the groups.

Correlation of ROS levels with DRE

Here, we subdivided our patient group depending on the outcome of the DRE: either negative (no abnormality detected) or positive (nodule or adenoma detected). The comparisons of all relevant factors between the negative DRE group and the positive DRE group are shown in Table 4. No significant differences in ROS levels (or other factors) were observed between patients with a normal or a cancerous diagnosis.

Table 1 Overview of all clinicopathological parameters of patients examined for prostate cancer risk (n = 43)

Age (years)	PSA (ng/ml)	PSA ratio	Digital rectal examination	Prostate size (ml)	Prostate biopsy (right)	Gleason score (right)	Affected cylinders (right)	Affected (right) (%)	Prostate biopsy (left)	Gleason score (left)	Affected cylinders (left)	Affected (left) (%)	ROS (Active)
55	4	7	Adenoma	37	Adenocarcinoma	7	2	40	No neoplasia	0	0	0	0.1100
54	5	25	Nodule	12	No neoplasia	0	0	0	Adenocarcinoma	6	3	30	0.0300
66	6	18	Adenoma	51	Adenocarcinoma	6	1	40	Adenocarcinoma	6	1	5	0.0350
60	10	12	Adenoma	60	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0425
65	6	14	Normal	49	Adenocarcinoma	7	2	15	Adenocarcinoma	7	1	20	0.0570
56	9	24	Adenoma	57	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.1880
51	5	0	Normal	41	No neoplasia	0	0	0	Adenocarcinoma	7	2	20	0.0570
66	7	13	Normal	38	Adenocarcinoma	6	2	25	Adenocarcinoma	7	2	20	0.0450
59	7	0	Normal	26	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0260
70	6	15	Adenoma	40	Adenocarcinoma	6	2	3	Adenocarcinoma	6	1	15	0.0320
69	5	0	Adenoma	27	Adenocarcinoma	7	2	30	Adenocarcinoma	6	1	70	0.1000
65	5	11	Adenoma	35	No neoplasia	0	0	0	Adenocarcinoma	7	1	60	0.0180
63	7	29	Normal	25	Adenocarcinoma	5	1	2	Adenocarcinoma	6	1	2	0.0700
46	9	0	Normal	32	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.4000
62	8	15	Adenoma	46	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0240
59	5	15	Adenoma	48	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0220
68	8	10	Normal	14	ASAP	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0380
60	4	13	Normal	13	No neoplasia	0	0	0	Adenocarcinoma	9	2	20	0.0370
56	5	12	Adenoma	49	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0405
71	6	0	Adenoma	20	Adenocarcinoma	9	2	10	No neoplasia	0	0	0	0.0125
53	6	19	Adenoma	19	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.047
56	5	23	Adenoma	31	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0555
64	5	0	Adenoma	35	ASAP	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0550
53	5	0	Adenoma	27	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0420
63	8	12	Normal	53	Adenocarcinoma	6	3	20	Adenocarcinoma	6	3	60	0.0110
72	11	0	Adenoma	52	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0200
66	5	0	Adenoma	28	Adenocarcinoma	6	1	30	ASAP	0	0	0	0.0350
69	4	0	Nodule	18	Adenocarcinoma	6	5	40	Adenocarcinoma	6	1	5	0.0515
67	6	0	Adenoma	24	Adenocarcinoma	6	3	5	No neoplasia	0	0	0	0.1345
56	4	0	Adenoma	77	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0200
68	7	0	Adenoma	21	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0355
58	15	0	Adenoma	25	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0200
58	10	0	Nodule	12	Adenocarcinoma	6	1	5	Adenocarcinoma	7	5	80	0.0360
45	18	0	Normal	22	No neoplasia	0	0	0	Adenocarcinoma	8	5	40	0.0595
50	10	0	Adenoma	69	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0590
67	6	17	Normal	48	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0370
71	10	20	Adenoma	30	Adenocarcinoma	7	1	10	Adenocarcinoma	7	2	30	0.0385
63	16	0	Normal	44	Adenocarcinoma	7	1	15	Adenocarcinoma	7	3	50	0.0590
58	5	9	Nodule	36	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0130
55	7	16	Normal	53	No neoplasia	0	0	0	No neoplasia	0	0	0	0.0790
79	7	12	Adenoma	34	Adenocarcinoma	6	1	30	Adenocarcinoma	6	1	5	0.0170
70	20	0	Nodule	101	No neoplasia	0	0	0	Adenocarcinoma	6	1	10	0.0090
54	10	0	Normal	43	No neoplasia	0	0	0	Adenocarcinoma	6	3	10	0.0130

ASAP, Atypical small acinar proliferation; PSA, prostate-specific antigen; ROS, reactive oxygen species.

Table 2 Differences in relevant parameters between patients in a group with negative biopsies (both left and right sides free of PCa) and a group with positive biopsies (left or right side with PCa detected)

	Negative biopsy		Positive biopsy		Mean differences significant?*
	Mean	SD	Mean	SD	
Age (years)	57.63	6.36	64.21	7.16	No
PSA (ng/ml)	7.32	2.79	7.83	4.35	No
PSA ratio	8.53	8.97	8.29	8.99	No
Prostate size (ml)	43.00	16.40	33.04	19.72	No
ROS (A_{510nm})	0.04537	0.03827	0.04594	0.03197	No

PCa, prostate cancer; PSA, prostate-specific antigen; ROS, reactive oxygen species.

*Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparison test ($P < 0.05$).

Table 3 Differences in relevant PCa parameters in relation to age

	Age group ≤ 60		Age group > 60		Mean differences significant?*
	Mean	SD	Mean	SD	
Age (years)	54.86	4.15	67.45	3.89	Yes
PSA (ng/ml)	7.52	3.74	7.88	3.77	No
PSA ratio	8.33	9.22	8.46	8.74	No
Prostate size (ml)	37.00	18.59	37.86	18.46	No
ROS (A_{510nm})	0.0491	0.0391	0.0424	0.0299	No

Patients were divided into a 'Junior' group (≤ 60 years; $n = 21$) and a 'Senior' group (> 60 years; $n = 22$).

PCa, prostate cancer; PSA, prostate-specific antigen; ROS, reactive oxygen species.

*Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test ($P < 0.05$).

Table 4 ROS levels and relevant parameters in seminal plasma classified according to a negative DRE result (normal; $n = 14$) or a positive DRE result (adenoma or nodule detected; $n = 29$)

	Negative DRE		Positive DRE		Mean differences significant?*
	Mean	SD	Mean	SD	
Age (years)	58.93	7.59	62.45	7.32	No
PSA (ng/ml)	8.43	3.98	7.21	3.59	No
PSA ratio	8.86	9.05	8.17	8.94	No
Prostate size (ml)	35.79	13.81	38.24	20.96	No
ROS (A_{510nm})	0.0449	0.0200	0.0461	0.0399	No

DRE, digital rectal examination; PSA, prostate-specific antigen; ROS, reactive oxygen species.

*Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparison test ($P < 0.05$).

Table 5 Classification of ROS levels and relevant semen parameters according to prostate volume

	Volume < 30 ml		Volume $30 < 50$ ml		Volume ≥ 50 ml		Mean differences significant?*		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Small vs. medium	Small vs. large	Medium vs. large
Prostate size (ml)	20.06	7.41	39.78	6.47	63.67	16.52	No	No	No
Age (years)	61.31	7.507	61.50	7.97	60.89	7.407	No	No	No
PSA (ng/ml)	7.375	3.914	8.89	2.91	9.44	4.53	No	No	No
PSA ratio	8.00	10.07	10.17	7.42	9.111	9.333	No	No	No
ROS (A_{510nm})	0.0484	0.0310	0.0408	0.0236	0.06072	0.05619	No	No	No

PSA, prostate-specific antigen; ROS, reactive oxygen species.

Small: prostate volume < 30 ml ($n = 16$); medium: prostate volume between 30 and 50 ml ($n = 18$); large: prostate volume ≥ 50 ml ($n = 9$).

*Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparison test ($P < 0.05$).

Table 6 Classification of ROS levels and relevant semen parameters according to PSA levels

	PSA medium ($4 < 10$ ng/ml)		PSA high (≥ 10 ng/ml)		Mean differences significant?*
	Mean	SD	Mean	SD	
PSA (ng/ml)	5.97	1.40	13.00	3.89	Yes
Age (years)	61.67	7.08	60.10	9.09	No
PSA ratio	9.97	8.86	3.20	7.00	No
Prostate size (ml)	35.27	14.79	44.60	28.22	No
ROS (A_{510nm})	0.0489	0.0376	0.0350	0.0190	No

PSA, prostate-specific antigen; ROS, reactive oxygen species.

PSA low: $0 < 4$ ng/ml ($n = 0$); PSA medium: $4 < 10$ ng/ml ($n = 33$); PSA high: ≥ 10 ng/ml ($n = 10$).

*Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparison test ($P < 0.05$).

Correlation of ROS levels with prostate size

Next, the patient group was classified according to their prostate size. The following widely accepted scale was used: $0 < 30$ ml (small), $30 < 50$ ml (medium), and ≥ 50 ml (large). The multiple comparisons of all relevant factors in relation to prostate size are shown in Table 5. No significant differences in ROS levels (or other factors) were observed between these patient subgroups.

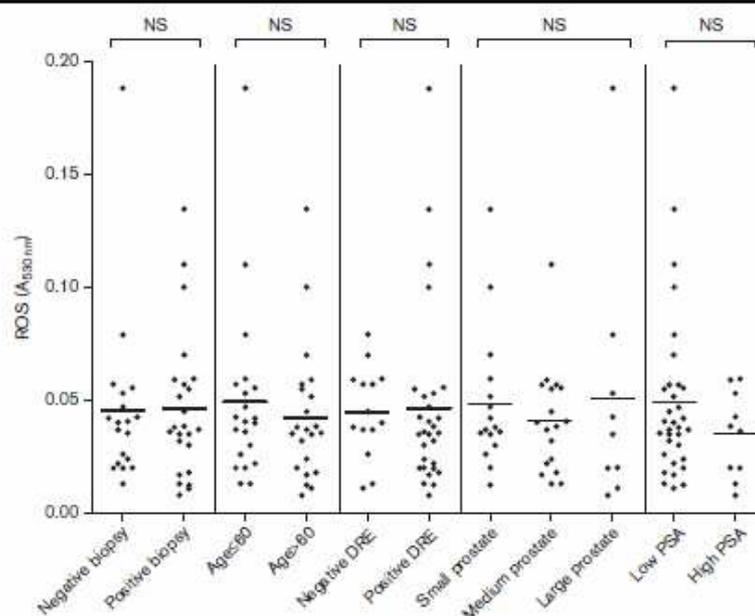
Correlation of ROS levels with PSA levels

Finally, the patient group was classified according to their PSA levels. The standard cutoff levels of PSA were applied: $0 < 4$ ng/ml; $4 < 10$ ng/ml; and ≥ 10 ng/ml. The comparisons of all relevant factors between patients with median versus high PSA values are shown in Table 6. Again, no significant differences in ROS levels (or other factors) were observed between these patient subgroups.

Discussion

In this paper, we aimed to predict PCa diagnosis by analyzing oxidative stress in seminal plasma. A visual representation of all ROS data is summarized in Fig. 1. Development of new screening methods for PCa is urgently required as an optimal method is still lacking. DRE has a low specificity and selectivity and is highly dependent on the judgment of the physician (Okotie *et al.*, 2007). Prostate biopsy is an invasive procedure,

Fig. 1



Overview of ROS values in relation to clinico-pathological parameters. Visual representation of ROS values in relation to (i) biopsy outcome, (ii) age groups, (iii) DRE outcome, (iv) prostate size, and (v) PSA values. Each point represents data from an individual patient ($P < 0.05$; NS). DRE, digital rectal examination; NS, not significant; PSA, prostate-specific antigen; ROS, reactive oxygen species.

with severe postprocedural infections reported (Loeb *et al.*, 2013). The PSA test was developed, which is safe and shows high sensitivity. Its major drawback, however, is its low specificity: for PSA values between 2.6 and 10 ng/ml, its specificity is about 25–35%. As a result, when a decision for a biopsy is solely based on the PSA test, over 75% of men are predicted to undergo unnecessary biopsies (Smith *et al.*, 1997). Although this method has been fine-tuned by the calculation of the PSA ratio of unbound PSA to total PSA, considerable controversy around the prognostic value of the PSA test remains and the United States Preventive Services Task Force is currently discouraging its use (Stampfer *et al.*, 2014).

Besides age, which is the main risk factor for PCa, oxidative stress and DNA damage are major contributing factors (Gupta-Elera *et al.*, 2012). Oxidative stress is typically higher in the epithelium of patients with PCa compared with healthy men, and the generation of ROS increases proportionally with the metastatic progression of PCa (Kumar *et al.*, 2008).

So what are the future challenges for improving PCa diagnosis? First, detection of PCa should be optimized to be easily detected in body fluids such as urine or seminal

plasma, thereby avoiding the discomfort and potential side effects of a prostate biopsy for the patients (Welch and Black, 2010). Second, a panel of proteins or other molecules should include a combined high sensitivity and specificity for PCa. One approach is the increasing use of proteomics to identify specific peptides associated with PCa. The choice of body fluid is very important as the proteins of interest should be present at detectable concentrations. For this reason, the use of serum from blood has led to little success (Ahn and Simpson, 2007). Urine is another easily accessible body fluid; however, the high salt concentration and the low protein abundance complicate proteomic analysis (Norden *et al.*, 2004). In contrast, seminal plasma is a protein-rich body fluid (40 mg/ml), which, in addition, shows high sample stability, making it a promising candidate for proteomics (Neuhaus *et al.*, 2013). As a result, the field of proteomics in the study of seminal plasma is growing rapidly (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011). Over 3000 different proteins in seminal plasma have been identified to date (Drabovich *et al.*, 2014). This integrative approach is leading to the identification of new biomarkers, some of which relate to PCa (Rolland *et al.*, 2013). Standardization of methods between groups is required, and more

importantly, validation of an effective biomarker for PCA is still lacking (You *et al.*, 2010).

Nonpeptide biomolecules are a complementary source of biomarkers for PCA. One example is isoprostanes, which are the end product of peroxidation of arachidonic acid and considered a consistent indicator of oxidative stress (Brys *et al.*, 2013). These authors showed that PCA patients show very high levels of isoprostanes in urine, a method that could be validated more easily than proteomics. Our experiments for measuring ROS with the NBT assay are also straightforward and sensitive in seminal plasma. Unfortunately, we did not observe any significant differences in ROS levels in relation to PCA parameters. This is most likely because of the high variability of the data set and could probably be ameliorated by the use of well-defined and larger patient groups.

Conclusion

In summary, this paper confirms that the current detection methods for PCA have their shortcomings and that a single method is clearly insufficient to obtain a correct diagnosis. Implementing complementary assays with validated biomarkers will certainly improve correct PCA diagnosis and reduce the number of unnecessary biopsies. Seminal plasma is particularly suited as an easily accessible body fluid, which, in addition, is highly related to the prostate. ROS quantification in seminal plasma – as studied here – is thus a robust method that should be further optimized and then implemented in routine PCA examination for patients.

Acknowledgements

The authors thank Dr Alexandros Nikolaou for the English revision of this paper.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- Ahn SM, Simpson RJ (2007). Body fluid proteomics: prospects for biomarker discovery. *Proteomics Clin Appl* 1:1004–1015.
- Aya M, Bott SR, Sheerji IS, Ahmed HU, Williamson M, Patel HR (2006). The metastatic cascade in prostate cancer. *Surg Oncol* 15:117–128.
- Baehner RL, Boxer LA, Davis J (1976). The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 48(2):309–313.
- Battistè V, Madens LD, Bagatini MD, Reetz LG, Chiesa J, Battistè IE, *et al.* (2011). Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients: relation to Gleason score, treatment and bone metastasis. *Biomed Pharmacother* 65:516–524.
- Brys M, Morel A, Forma E, Kzeslak A, Wilkosz J, Rozanski W, Olas B (2013). Relationship of urinary isoprostanes to prostate cancer occurrence. *Mol Cell Biochem* 372:149–153.
- Bubendorf L, Schöpfer A, Wagner U, Sauter G, Moch H, Wili N, *et al.* (2000). Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1589 patients. *Hum Pathol* 31:578–583.
- Bui M, Zhu X, Valtagni R, Pickles T, Kalehi Y, Rannikko A, *et al.* (2013). Active surveillance for low-risk prostate cancer worldwide: the PRIAS study. *Eur Urol* 63:597–603.
- Dimovich AP, Samon P, Jani K, Diamandis EP (2014). Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nat Rev Urol* 11:279–288.
- Epstein JI, Allbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL, ISUP Grading Committee (2005). The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 29:1228–1242.
- Felgueiras J, Silva JV, Fardilha M (2014). Prostate cancer: the need for biomarkers and new therapeutic targets. *J Zhejiang Univ Sci B* 15:16–42.
- Freddolini C, Lotta LA, Petricoin EF (2010). Application of proteomic technologies for prostate cancer detection, prognosis, and tailored therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 47:125–138.
- Gupta-Elena G, Garrett AR, Robison RA, O'Neil KL (2012). The role of oxidative stress in prostate cancer. *Eur J Cancer Prev* 21:155–162.
- Ilic D, Neuberger MM, Djubagovic M, Dahm P (2013). Screening for prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 1:CD004720.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69–90.
- Kumar B, Koul S, Khandrika L, Meacham RB, Koul HK (2008). Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res* 68:1777–1785.
- Loeb S, Ghaffi SN, Catalona WJ (2006). Exclusion of inflammation in the differential diagnosis of an elevated prostate-specific antigen (PSA). *Urol Oncol* 27:64–68.
- Loeb S, Velkkoop A, Ahmed HU, Catto J, Emberton M, Nam R, *et al.* (2013). Systematic review of complications of prostate biopsy. *Eur Urol* 64:876–892.
- Miller DC, Hater KS, Stewart A, Montie JE, Wei JT (2003). Prostate carcinoma presentation, diagnosis, and staging: an update from the National Cancer Data Base. *Cancer* 98:1166–1178.
- Nadler RB, Humphrey PA, Smith DS, Catalona WJ, Ratih TL (1995). Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels. *J Urol* 154 (Pt 1):407–413.
- Neubaus J, Schiffer E, von Wicke P, Bauer HW, Leung H, Sway J, *et al.* (2013). Seminal plasma as a source of prostate cancer peptide biomarker candidates for detection of indolent and advanced disease. *PLoS One* 8:6.
- Norden AG, Sharatt P, Cutilas PR, Cramer R, Gardner SC, Urwin RJ (2004). Quantitative amino acid and proteomic analysis: very low excretion of polypeptides > 750 Da in normal urine. *Kidney Int* 66:1994–2003.
- Okoto OT, Roehl KA, Han M, Loeb S, Ghaffi SN, Catalona WJ (2007). Characteristics of prostate cancer detected by digital rectal examination only. *Urology* 70:1117–1120.
- Pinto F, Totato A, Calamo A, Sacco E, Volpe A, Racioppi M, *et al.* (2011). Imaging in prostate cancer diagnosis: present role and future perspectives. *Urol Int* 86:373–382.
- Rodriguez-Martinez H, Krist U, Emenudh J, Sanz L, Calvete JJ (2011). Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am J Reprod Immunol* 66 (Suppl 1):11–22.
- Rolland AD, Lavigne R, Daulty C, Calvel P, Konarsnc C, Freour T, *et al.* (2013). Identification of genital tract markers in the human seminal plasma using an integrative genomics approach. *Hum Reprod* 28:199–209.
- Schiffer E, Bick C, Grzelj B, Petzler S, Schiffer W (2012). Urinary proteome analysis for prostate cancer diagnosis: cost-effective application in routine clinical practice in Germany. *Int J Urol* 19:119–125.
- Schulder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, *et al.* (2012). Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. *N Engl J Med* 366:981–990.
- Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A (2014). Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64:9–29.
- Smith DS, Humphrey PA, Catalona WJ (1997). The early detection of prostate carcinoma with prostate specific antigen: the Washington University experience. *Cancer* 80:1852–1856.
- Stampfer MJ, Jahn JL, Gann PH (2014). Further evidence that prostate-specific antigen screening reduces prostate cancer mortality. *J Natl Cancer Inst* 106:3.
- Theodorescu D, Schiffer E, Bauer HW, Douwes F, Eichhorn F, Polley R, *et al.* (2008). Discovery and validation of urinary biomarkers for prostate cancer. *Proteomics Clin Appl* 2:556–570.
- Ukamura O, Coleman JA, de la Taille A, Emberton M, Epstein JI, Freedland SJ, *et al.* (2013). Contemporary role of systematic prostate biopsies: indications, techniques, and implications for patient care. *Eur Urol* 63:214–230.
- Welch HG, Black WC (2010). Overdiagnosis in cancer. *J Natl Cancer Inst* 102:605–613.
- You J, Cozzi P, Walsh B, Wilcox M, Keaneley J, Russell P, *et al.* (2010). Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 73:10–22.

