

UNIVERSITAT DE BARCELONA
DIVISIÓ DE CIÈNCIES DE LA SALUT
FACULTAT DE MEDICINA
Departament de Biologia Cel.lular i Anatomia Patològica

**ESTUDI DE LES ALTERACIONS DELS MECANISMES
REGULADORS DEL CICLE CEL.LULAR, APOPTOSI
I INVASIÓ EN EL CARCINOMA DE PRÒSTATA**

Directors: Prof. Dr. Antonio Cardesa García
Dr. Pedro Luis Fernández Ruiz

Tesi Doctoral presentada per Xavier Farré Pueyo
per accedir al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia

Barcelona, Abril del 2002

AGRAÏMENTS

Són moltes les persones que han contribuït amb el seu recolzament, ànims o consells a que aquesta Tesi hagi pogut tirar endavant. A totes elles va dirigit el meu sincer reconeixement. Faig constar expressament el meu agraïment a les següents persones i institucions:

Al Prof. Antonio Cardesa García, Catedràtic d'Anatomia Patològica de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona, Cap del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona i director d'aquesta Tesi, per haver-me facilitat la realització d'aquesta tesi. També li he d'agrair la formació rebuda durant el meu període com a Metge Intern Resident en el seu Servei, i el fet de facilitar-me l'aprenentatge dels coneixements necessaris per tal de desenvolupar tasques d'investigació.

Al Dr. Pedro Luis Fernández Ruiz, Metge Especialista Sènior del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona i codirector d'aquesta Tesi, per haver recolzat incondicionalment la realització d'aquesta tesi, fins i tot en els moments més difícils. A ell, a més de considerar-lo un excel.lent professional i amic, li he d'agrair el haver-me introduït i ensenyat el difícil tema de la patologia prostàtica. Amb els anys i el seu suport, he pogut participar en diversos treballs sota la seva direcció i, fruit de tot això, ha estat possible la realització d'aquesta tesi.

Al Dr. Elías Campo Güerri, Cap de la Secció de Hematopatologia i Biologia Molecular del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, per haver estat la primera persona que em va ensenyar Anatomia Patològica a la Facultat de Medicina de Lleida, per haver estimulat la meva vocació investigadora i per haver donant facilitats i valuosos consells que han resultat, al cap i a la fi, imprescindibles per poder dur a terme aquesta tesi.

Al Dr. Antonio Palacín Forgue, Cap de la Secció d'Immunohistoquímica del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, per haver facilitat la realització dels estudis immunohistoquímics que componen aquesta tesi. Des d'aquestes línies també li vull expressar la meva admiració personal pel seu extraordinari coneixement de l'Anatomia Patològica, per la seva humilitat i per la seva qualitat docent fruit de la seva dilatada experiència professional.

A Nerea Peiró, Iracema Nayach i Eva Fernández, del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, i al Personal Tècnic de la Clínica l'Aliança de Barcelona, per l'ensenyament pràctic i la col.laboració en la realització de tècniques immunohistoquímiques.

A la Dra. Carmé Mallofré i en Jaume Muntané del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, pel seu interès en ajudar-me en la part de l'estudi corresponent a la citometria de flux.

A la resta del personal mèdic, adjunts i companys residents, així com al personal de la sala d'autòpsies i secretàries del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic i Provincial per les seves aportacions en aquesta tesi.

Al Dr. Antonio Alcaraz i la Dra. Maria José Ribal, del Servei d'Urologia de l'Hospital Clínic i Provincial, per la seva aportació de coneixements i dades clíniques dels pacients.

A la Dra. Bonnie Sloane, de la Wayne State University de Detroit i als Dr. Guo-Ping Shi i Harold Chapman de l'Hospital Brigham and Women's i la Universitat de Harvard a Boston, pel subministrament d'anticossos no comercials anti-catepsina B i S, sense els quals no s'hauria pogut realitzar aquesta tesi.

A en Joan Rodó, Pilar Luque, Coia Romeu, Antonia Bertomeu, Gorane Santamaria i Miguel Caballero, per haver-me permès desenvolupar tasques corresponents als seus projectes d'investigació en un ambient de treball immillorable.

Al personal mèdic, particularment el Dr. Josep Vila, i també al personal tècnic i secretàries del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Sant Joan de Déu per la seva inestimable amistat i per haver contribuït en la meva formació com a patòleg i investigador.

Al personal mèdic, tècnic i secretàries del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Arnau de Vilanova de Lleida, pel seu bon tarannà i per ser les primeres persones amb qui vaig poder disfrutar de debò de l'Anatomia Patològica.

A la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología per atorgar la subvenció necessària per portar a terme el projecte en el qual s'inclogué aquesta tesi.

Al Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas de Madrid, per haver-me facilitat la finalització d'aquesta tesi.

Als meus pares i germana per haver estat sempre al meu costat.

A totes les persones que m'han considerat el seu amic i han tingut la paciència d'aguantar-me en els meus moments dolents.

I. INTRODUCCIÓ	5
A. EPIDEMIOLOGIA DEL CÀNCER DE PRÒSTATA	8
B. ETIOLOGIA DEL CÀNCER DE PRÒSTATA	13
B.1. Lesions precursors	13
B.2. Factors personals i constitucionals	17
B.3. Factors racials	19
B.4. Factors genètics	20
B.5. Factors hormonals	22
B.6. Factors dietètics	23
B.7. Factors mediambientals i ocupacionals	24
B.8. Miscel.lània	24
C. FACTORS PRONÒSTICS	26
D. MECANISMES MOLECULARS DE PROGRESSIÓ DEL CÀNCER	41
D.1. El cicle de divisió cel.lular	41
D.2. Apoptosi	52
D.3. Mecanismes d'invasió tumoral i metàstasi	61
E. BASES MOLECULARS DEL CÀNCER DE PRÒSTATA	64
F. RESUM FINAL	72
II. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS	78
III. MATERIAL I MÈTODES	80
A. SELECCIÓ DELS TEIXITS	81
B. ESTUDI HISTOLÒGIC	81
C. ANÀLISI MICROSCÒPICA DELS TALLS HISTOLÒGICS I OBTENCIÓ DELS PARÀMETRES CLÍNICO-PATOLÒGICS	83
D. ANÀLISI DE LA PLOIDIA I LA PROLIFERACIÓ CEL.LULAR	86
E. DETERMINACIONS EXPERIMENTALS	89
F. ANÀLISI ESTADÍSTICA	100
IV. RESULTATS	103
A. ANÀLISI DELS PARÀMETRES CLÍNICO-PATOLÒGICS	104
B. ESTUDI DE LA PLOIDIA I LA PROLIFERACIÓ CEL.LULAR	114
C. ESTUDIS EXPERIMENTALS IMMUNOHISTOQUÍMICS	117
C.1. Estudi de l'expressió de p53, Bcl-2 i p21 ^{Waf1/Cip1}	118
C.2. Estudi de l'expressió de p27 ^{Kip1}	136
C.3. Estudi de l'expressió de les catèpsines B i S	144
D. RESUM DELS RESULTATS OBTINGUTS	154
V. DISCUSSIÓ	157
VI. CONCLUSIONS	187
VII. BIBLIOGRAFIA	190

I. INTRODUCCIÓ

La transformació maligna dels teixits és el resultat d'un procés que consta de múltiples etapes, on diverses alteracions genètiques empitjoren progressivament el control de la proliferació cel.lular i les seves característiques fenotípiques. La progressió tumoral implica una selecció de cèl.lules amb alteracions somàtiques que activen els oncògens i inactiven els gens supressors tumorals. Aquestes alteracions dirigeixen les cèl.lules a través del cicle cel.lular provocant proliferació incontrolada i alteracions en els mecanismes d'apoptosi, ocasionant la immortalització de les cèl.lules neoplàsiques; i l'adquisició de propietats per part d'aquestes cèl.lules per tal d'afavorir la seva capacitat invasiva i metastàsica. Per tant, aquests aspectes són considerats objectius principals en la investigació de qualsevol tipus de càncer.

Un dels òrgans del cos humà on més freqüentment s'observa la transformació maligna de les seves cèl.lules és la pròstata, essent l'adenocarcinoma el tipus histològic més freqüent de càncer en aquesta localització. Malgrat tot això, existeixen altres tipus histològics de neoplàsies malignes, com els carcinomes neuroendocrins, limfomes i sarcomes, els quals constitueixen menys del 1 % de les neoplàsies malignes a la pròstata. Aquest fet fa que el carcinoma de pròstata (CP) sigui gairebé sinònim d'adenocarcinoma en aquesta localització.

El CP és un tumor genèticament heterogeni i la seva patologia molecular és força complexa, essent encara poc coneguda. En els darrers anys s'ha incrementat molt l'interès pel que fa al paper dels gens supressors tumorals i l'apoptosi en la patogènesi del CP. L'interès s'ha estès als factors de creixement i a gens relacionats amb l'adquisició de capacitat invasiva i inducció de metàstasi.

Donada la seva complexitat, el CP ha estat poc estudiat fins fa poc temps. No obstant, durant la passada dècada, el CP ha anat deixant de considerar-se com la "ventafocs" dins la recerca del càncer. Existeixen 4 motius principals que han motivat aquest canvi de concepció:

1) S'ha evidenciat la magnitud del CP a escala mundial. Actualment, el CP és el càncer no cutani amb més incidència als Estats Units (EUA) i els països escandinaus. A més, és la segona causa de mort per càncer en l'home després del càncer de pulmó.

2) El paper controvertit de l'antigen específic prostàtic (PSA) com a modalitat primària de cribatge juntament amb el desenvolupament de la prostatectomia radical (PR) com a procediment terapèutic definitiu en el maneig del CP inicial.

3) L'elevada prevalença de la hiperplàsia benigna de pròstata (HBP) i la morbiditat associada amb aquesta malaltia ha estimulat una sèrie d'investigacions que han donat com a resultat un augment de la comprensió de la biologia del desenvolupament de la glàndula prostàtica, particularment en la importància que té la interacció entre l'estroma i l'epiteli.

4) L'expansió del model de CP amb rates Dunning, juntament amb els més avançats sistemes de desenvolupament cel·lular, proveeix actualment una sèrie de variants de cèl·lules epitelials prostàtiques, derivades clonalment, genotípicament estables i de comportament divers, útils per la investigació de la seva patogènesi.

L'anàlisi comparativa d'aquestes línies de cèl·lules fenotípicament distintes en aquests sistemes ha aportat una oportunitat única per identificar factors individuals que determinin aspectes particulars del comportament de les cèl·lules canceroses prostàtiques. Aquests factors, juntament amb els avenços recents en les tècniques biològiques cel·lulars i moleculars, s'estan revelant com processos fonamentals en l'etiopatogènia de la neoplàsia prostàtica epitelial. Per tant, havent ja entrat al segle XXI, els estudis del CP són actualment capdavanters en la recerca bàsica del càncer.

El model del CP presenta la interessant qualitat, que també s'observa en altres òrgans, com la mama o el colon, de contar amb lesions preneoplàsiques que, des del punt de vista histològic, recapitulen la progressió fenotípica de les cèl·lules prostàtiques des del teixit normal al neoplàsic, amb el que es fa teòricament possible l'estudi de la progressió tumoral des dels seus primers estadis. Així, en la pròstata es reconeix com a lesió premaligna

L'anomenada Neoplasia Prostàtica Intraepitelial (en anglès, PIN), que d'una forma molt similar a la hiperplàsia atípica i al carcinoma "in situ" mamari o als adenomes displàsics del colon, progressaria cap a la lesió invasiva, existint evidents semblances fenotípiques i genètiques que recolzarien aquesta hipòtesi.

A. EPIDEMIOLOGIA DEL CÀNCER DE PRÒSTATA

A.1. CARCINOMA

Sense considerar els tumors cutanis, el CP és el tumor maligne més freqüent en l'home a nivell mundial. S'estima una prevalença, basada en estudis histològics, de més del 30% d'homes més grans de 50 anys, augmentant fins a un 80% als 80 anys ¹.

Fins a la dècada dels anys 90, tant la incidència com la mortalitat van anar augmentant, amb un pic màxim d'incidència entre 1989 i 1992 ². Posteriorment, entre els anys 1991 i 1995, l'índex de mortalitat per CP va disminuir, tot i el creixent envelliment de la població masculina ³. Aquestos canvis en la incidència es troben relacionats, almenys parcialment, amb l'aparició de noves eines diagnòstiques com l'antigen prostàtic específic sèric (PSA) i la ultrasonografia prostàtica, a més de l'augment en el coneixement de la malaltia per part de la població. Això ha suposat un augment de fins a un 60% entre 1986 i 1994 en el diagnòstic dels tumors clínicament localitzats i potencialment curables. Malgrat tot això, encara hi ha una proporció significativa de pacients que presenten malaltia disseminada en el moment del diagnòstic inicial, representant, en aquests casos, una malaltia difícilment curable.

La incidència és elevada a Amèrica del Nord, sobretot en la població de raça negra, i a la d' Austràlia. Zones que tenen una incidència intermèdia són les del nord i l'oest d'Europa, Amèrica Llatina i les poblacions asiàtiques dels Estats Units d'Amèrica (EUA). Els registres que tenen unes taxes més baixes d'incidència són els situats al sud i a l'est d'Europa, a l'Àsia i a l'Àfrica ⁴.

Com s'ha esmentat abans, als EUA el CP és la neoplàsia interna més freqüent, amb una estimació de 179.300 nous casos l'any 1999. El CP és la segona causa de mortalitat, només superat pel càncer de pulmó, amb una mortalitat estimada de 37.000 casos als EUA l'any 1999⁵. A la Unió Europea es diagnostiquen al voltant de 85.000 nous casos per any, amb una previsió per l'any 2020 de 118.000 nous casos⁶.

La següent taula (Taula 1) resumeix la incidència i mortalitat a nivell mundial en diferents països del món:

RISC	PAÍS	INCIDÈNCIA 1973-1977	INCIDÈNCIA 1988-1992	MORTALITAT 1973-1977	MORTALITAT 1988-1992
Alt risc	EUA (negres, SEER*)	79.9	137.0	27.6	34.3
	EUA (blancs, SEER*)	47.9	100.8	13.4	15.7
	Canadà (BC)	39.8	84.9	14.3	17.0
	Suècia	44.4	55.3	21.6	20.8
	Austràlia (NSW)	28.4	53.5	15.6	17.9
	França (Bas-Rhin)	23.0	48.1	15.0	17.1
Risc mitjà	Dinamarca	23.6	31.0	13.5	18.6
	Anglaterra (S. Thames)	20.1	29.3	12.1	16.8
	Itàlia (Varese)	22.8	28.2	10.5	11.5
	Espanya (Navarra)	17.6	27.2	12.4	13.1
	Israel (jueus)	15.5	23.9	7.5	9.0
Baix risc	Singapur (xinesos)	4.8	9.8	1.9	3.7
	Japó (Miyagi)	4.9	9.0	2.4	3.8
	Hong Kong	5.1	7.9	2.1	2.8

Taula 1. Incidència i mortalitat per CP a diferents poblacions mundials representatives. Entre parèntesi hi figura la població o registre d'on s'ha determinat la incidència. Els valors són per 100.000 persones-any, amb edat ajustada a l'estàndar mundial².

* La base de dades de la SEER es accessible de franc a Internet i, actualment, conté dades corresponents al període 1973-1998. L'adreça web és: <http://www-seer.ims.nci.nih.gov> (comprovada el 25 de Juliol de 2001).

Cal destacar també les diferències que hi han entre les poblacions de les diverses ètnies dels EUA i les poblacions dels seus països d'origen, les quals revelen unes variacions d'incidència molt importants. L'increment entre la població negra és el més destacable i no es pot explicar per una variació de la

taxa d'autòpsia entre les diverses ètnies dels EUA ⁷. Així, mentre la població negra de la ciutat de Los Angeles presenta una de les taxes més elevades, la població xinesa resident allí presenta una taxa molt més baixa.

Per conèixer la incidència del CP a Espanya i, particularment a Catalunya, disposem de registres de tumors hospitalaris i poblacionals. El Departamento Nacional de Estadística y Epidemiología de la Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer ha anat recollint les dades d'incidència a Espanya dels diversos tumors humans. Segons aquestes dades, el càncer de pròstata és el quart tumor més freqüent pel darrera del càncer de pulmó, de pell no melanoma i del colo-rectal. Ens els darrers anys ha superat en freqüència al càncer de bufeta urinària i laringe ⁸.

La següent taula resumeix aquestes dades i, a més, s'han afegit les dades del registre de tumors de l'Hospital Clínic de Barcelona:

Any	Freqüència relativa (Espanya)	Freqüència relativa (Hospital Clínic)
1993	6.0 % (6 ^a)	6.2 % (6 ^a)
1994	7.1 % (5 ^a)	6.4 % (5 ^a)
1995	8.0 % (4 ^a)	8.0 % (4 ^a)
1996	8.5 % (4 ^a)	7.0 % (4 ^a)

Taula 2. Freqüència relativa dels tumors de pròstata respecte al total de tumors, segons el conjunt de Registres Hospitalaris de tumors i el Registre de tumors de l'Hospital Clínic de Barcelona. Entre parèntesis, ordre de freqüència del carcinoma de pròstata respecte a la resta de tumors.

Des de l'any 1980, a Catalunya disposem del Registre poblacional del Càncer de Tarragona (RCT). Segons dades corresponents a l'any 1992, el CP és la cinquena localització més freqüent en aquest registre, pel darrera del càncer de pulmó, pell no melanoma, colo-rectal i el de bufeta urinària. Representa el 10,9 % dels càncers en l'home. La corba d'edat mostra que els primers casos apareixen al voltant dels 50 anys i tendeix a un gran increment de la incidència a partir dels 65 anys, per arribar a triplicar-se en els grups d'edat més avançada. La mitjana

d'edat al diagnòstic és de 74,3 anys. A diferència d'altres registres, al RCT el CP no ha experimentat cap increment significatiu en els últims anys⁹.

Referent a la **mortalitat**, segons el Centro Nacional de Epidemiología obtingudes a Internet (<http://193.146.50.130>, comprovada el 25 de Juliol de 2001), l'any 1997 a Espanya es varen produir 5.460 defuncions per CP (9,9 % del total de càncers), amb una edat mitjana en el moment de la defunció de 74,7 anys. El CP és la tercera causa de mort per càncer en els homes, a Espanya, després del càncer de pulmó i el colo-rectal, tot i que és una malaltia molt restringida als grups d'edat avançada. Aquestes dades estan per sota de les que s'obtenen a països d'alt risc, com als EUA i, com es reflexa a la taula anterior (taula 1), la mortalitat per 100.000 habitants-any durant el període 1988-1992 va ser de 34,3 a la raça negra i el 15,7 a la raça blanca, enfront de 13,1 obtingut al registre de Navarra en el mateix període².

A Catalunya, la mortalitat per 100.000 habitants l'any 1992 va ser de 14,1. No obstant, no s'observen canvis significatius en l'evolució de la mortalitat per aquest càncer ni presenta cap patró de distribució geogràfica clara. De tota manera, les taxes de mortalitat observades a Catalunya són força similars a les dels països europeus, amb l'excepció de Grècia, que presenta una taxa notablement baixa en el període 1965-1985 i sensiblement reduïda respecte als països d'alt risc com els EUA⁴.

A.2. PIN

Respecte a l'epidemiologia de la PIN, la reunió del grup de treball de la OMS de l'any 2000 sobre lesions premalignes de la pròstata va revisar aquesta qüestió en profunditat¹⁰. Es va trobar que la prevalença de la PIN d'alt grau era molt variable depenent del tipus de mostra tissular avaluada, la cohort estudiada, els criteris diagnòstics i el processament de les mostres. Amb tot això, un resum dels resultats exposats es mostra a la pàgina següent (taula 3).

Segons un estudi realitzat a la Fundació Puigvert de Barcelona, la prevalença de la PIN d'alt grau a Barcelona en mostres de biòpsia amb agulla ($n = 2.807$) fou del 4,4% ¹¹ i la incidència del CP al repetir la biòpsia fou del 28,7 % en els casos on s'havia aïllat PIN d'alt grau en la biòpsia inicial.

TIPUS DE MOSTRA	POBLACIÓ (NOMBRE D'ESTUDIS)	PREVALENÇA DE PIN (MITJANA)
Biòpsia amb agulla	Europa (7)	0,7 - 15,2 (9,1)
	EUA (6)	2,3 - 15 (8,0)
	Àsia (2)	3,2 - 4,4 (3,8)
Resecció transuretral	Europa (4)	10 - 60 (43,4)
	EUA (2)	2,3 - 4,2 (3,3)
Prostatectomia radical	Europa (2)	64 - 65 (64,5)
	EUA (5)	52,7 - 89 (74,5)
	Àsia (2)	67,6 - 76 (71,8)
Necròpsia	Europa (1)	44,6 (44,6)
	EUA (3)	37,8 - 62,5 (48,1)
	Brasil (1)	84,4 (84,4)

Taula 3. Prevalença de la PIN als diferents tipus de mostres prostàtiques. Resum dels estudis més importants publicats.

En un altre estudi realitzat a Córdoba ¹², no inclòs en la revisió del grup de treball de la OMS, la incidència de PIN d'alt grau fou del 17,0 % en els casos de biòpsia amb agulla ($n = 188$), del 10,1 % en les RTU i adenomectomies ($n = 267$), i del 50 % en peces de cistoprostatectomia radical ($n = 44$).

D'altra banda, en l'estudi amb un nombre de casos mai reportat ($n = 132.426$) ¹³, realitzat amb mostres de biòpsia als EUA, es trobà PIN d'alt grau en el 3,7 % de les mostres, foren sospitoses de PIN un altre 0,3 %, es diagnosticaren com a benignes el 61,8 % i es trobà CP en un 22,6 % al rebiopsiar els malalts on es va trobar PIN d'alt grau en la biòpsia inicial.

En l'estudi amb més casos estudiats amb peces de prostatectomia radical ($n = 1.439$) ¹⁴, també realitzat als EUA, es trobaren focus de PIN d'alt grau

en el 89% de les mostres i fou l'estudi amb un més alt percentatge de PIN d'alt grau de tots els que s'han realitzat amb peces de prostatectomia radical.

B. ETIOLOGIA DEL CÀNCER DE PRÒSTATA

Les causes responsables del desenvolupament del CP són desconegudes i no existeixen dades concluent pel que fa a la incidència de factors desencadenants. Amb l'excepció de l'edat, la raça, la història familiar i, possiblement, el greix de la dieta, els estudis realitzats no han permès establir els factors de risc (o protectors) en relació al CP. A continuació es comenten més extensament els diversos factors estudiats:

B.1. LESIONS PRECURSORES

b.1.1) PIN

La Neoplàsia Intraepitelial Prostàtica (PIN) és una proliferació neoplàsica, sovint multicèntrica, que es troba limitada a l'epiteli glandular i que no trenca la membrana basal. La referència més antiga d'aquesta lesió data de l'any 1926 ¹⁵, però no va ser fins a l'any 1965, quan es va considerar la seva possible naturalesa premaligna ¹⁶. L'any 1986 es van descriure criteris diagnòstics i reproduïbles i la van anomenar com a "displàsia intraductal", la qual es va classificar en tres graus ¹⁷. La denominació PIN fou proposada l'any 1987 ¹⁸ i finalment adoptada l'any 1989 en una taula de treball de lesions premalignes de l'American Cancer Society i el National Cancer Institute ¹⁹. També en aquesta taula de treball es va recomanar subdividir la PIN en només dos graus (alt i baix grau) segons la severitat de les alteracions morfològiques, essent actualment la classificació més utilitzada en la seva diagnosi. En aquesta tesi es considerarà PIN com a sinònim de PIN d'alt grau, mentre no s'especifiqui cap altra cosa.

La PIN es defineix per una sèrie de criteris arquitectònics i citològics que inclouen la pèrdua progressiva de la disposició en bicapa amb la desaparició, finalment, de les cèl.lules basals²⁰⁻²². També és característica la proliferació cel.lular en conductes i àcins prostàtics presentant canvis citològics que simulen el CP, particularment l'augment de la mida nuclear i nucleolar.

Hi han 4 patrons principals de PIN d'alt grau (ondulat, micropapilar, cribiforme i aplanat). El patró ondulat (en anglès, "tufting") és el més comú, i es troba present en el 97% dels casos, encara que en moltes ocasions s'associa amb múltiples patrons. No es coneixen diferències clínicament importants entre els diferents patrons arquitectònics de PIN d'alt grau, i el seu reconeixement sembla tenir només utilitat diagnòstica. Altres patrons inusuals de PIN inclouen el patró en cèl.lules en "anell de segell", el neuroendocrí de cèl.lula petita, el mucinós i el de cèl.lules espumoses²³. La PIN s'associa amb anomalies progressives del fenotip i genotip, intermèdies entre l'epiteli prostàtic normal i el càncer, indicant empitjorament en la diferenciació cel.lular i del control regulador de la proliferació en estadis inicials de la carcinogènesi prostàtica.

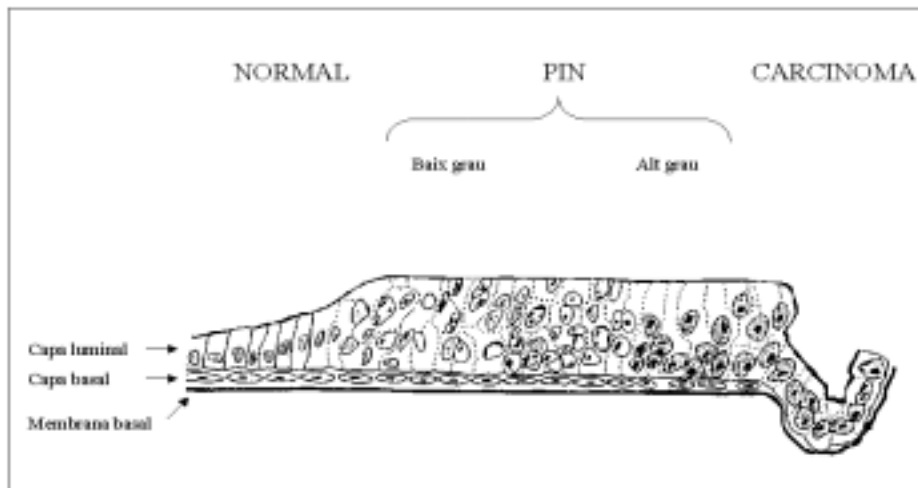


Fig. 1. Continuitat morfològica des de l'epiteli prostàtic normal mitjançant graus incrementats de PIN fins al carcinoma invasiu inicial, d'acord amb el concepte de progressió de la malaltia. Modificat de Bostwick DG i Brawer MK²¹.

La expressió immunohistoquímica de la citoqueratina d'alt pes molecular 34βE12 en aquestes glàndules confirma la presència de cèl.lules basals i ajuda a distingir entre PIN d'alt grau i carcinoma invasiu, encara que s'ha descrit expressió d'aquesta citoqueratina en uns pocs casos de carcinoma metastàtic ²⁴. També s'ha de diferenciar de la invasió intraductal i intraacinar del carcinoma de pròstata, que es caracteritza fonamentalment per la presència de masses cel.lulars malignes a dins de les llums ductals i acinars, sense contactar amb les cèl.lules basals ²⁵.

La importància clínica de reconèixer la PIN es basa en la seva forta associació amb el CP. El paper de la PIN com a precursor de CP ha estat confirmat recentment amb dos estudis experimentals independents utilitzant ratolins transgènics ^{26, 27}. Coexisteix amb el CP en més del 85% dels casos, especialment a la part perifèrica de la pròstata. El risc de CP concurrent es troba relacionat més amb el volum de PIN a la pròstata que a la seva presència absoluta. Per tant, la PIN té un valor predictiu alt com a marcador de CP i la seva identificació en mostres de biòpsia prostàtica indica proseguir l'estudi de CP concurrent al malalt. Tant el tractament radioteràpic com la teràpia de deprivació d'andrògens sembla que disminueixen la prevalença i l'extensió de la PIN ²¹. Això ha fet pensar que malalts amb PIN podrien ser uns candidats ideals per la quimioprevenció del CP.

b.1.2) Hiperplàsia adenomatosa atípica

La hiperplàsia adenomatosa atípica (HAA) ²⁸ es caracteritza per una proliferació circumscrita de glàndules petites i densament agrupades que, més que semblar invasives, tendeixen a confluir amb les glàndules benignes del voltant. Les cèl.lules tenen un citoplasma clar amb secrecions intraluminals variables. Arquitectònicament, l'HAA sembla un adenocarcinoma ben diferenciat i molts casos de CP amb un grau 1 de Gleason es podrien considerar que, en realitat, són HAA. El reconeixement de la capa basal exclou el diagnòstic de CP. Malauradament, la identificació de l'epiteli basal es sovint difícil, ja que generalment es troba atenuat i, fins i tot, pot arribar a ser

discontinuu. En aquestos casos està indicat utilitzar la queratina d'alt pes molecular 34 β E12. El criteri més important per diferenciar HAA de CP és la morfologia nuclear i nucleolar. Així, les cèl.lules del CP presenten nuclis grans i clars amb un patró de cromatina irregular o fina. La major part de casos (86%) d'HAA estan localitzats a la zona de transició. La incidència d'HAA a les mostres de pròstata varia entre un 2,2% i un 23%. L'HAA s'ha considerat una lesió premaligna per diverses troballes com la seva incidència augmentada en relació amb CP (15% en pròstates sense CP enfront d'un 31% de pròstates amb CP en estudis autòpsics), la seva relació topogràfica amb el CP de petits àcins i per trobar-se casos rars amb anormalitats genètiques. Tanmateix, alguns autors creuen que la relació entre HAA i CP és un epifenomen i les dades obtingudes són insuficients per arribar a una conclusió sobre la seva naturalesa premaligna, ja que no s'ha documentat una transició directa entre HAA i CP.

b.1.3) Atròfia inflamatòria proliferativa

Recentment, s'ha descrit una nova lesió que s'ha anomenat "Atròfia inflamatòria proliferativa" (PIA) ²⁹. Consisteix en la presència de dues capes cel.lulars juntament amb cèl.lules inflamatòries mononuclears i polimorfonuclears tant al compartiment epitelial com a l'estromal i atròfia estromal amb un cert grau de fibrosi.

Aquesta lesió es caracteritza per ser glutatió-S-transferasa de classe π (GSTP-1) (+), Bcl-2 (+) i per la inhibició de la tinció de p27^{Kip1}. Donat que GSTP-1 és un enzim que sembla protegir a les cèl.lules de la lesió de l'ADN i s'expressa, en l'epiteli normal, només a les cèl.lules basals. Això suggereix que la PIA seria una resposta induïda per l'estrés cel.lular.

La importància d'aquesta lesió és motivada per la hipòtesi que podria representar una lesió precursora de PIN, segons diverses troballes fenotípiques i també pel fet d'haver-se observat zones de PIA que conflueixen amb la PIN d'alt grau en una mateixa glàndula. Tanmateix, aquesta hipòtesi va

ser rebutjada en estudis autòpsics de l'atròfia a la dècada 1960-1970 i actualment no es disposa encara de prou dades que la recolzin.

b.1.4) Altres lesions

No s'ha trobat relació entre la **hiperplàsia benigna** prostàtica i un augment en el risc de patir CP³⁰. Tampoc s'ha evidenciat relació amb el CP pel que fa a la **hiperplàsia postatròfica**³¹.

B.2. FACTORS PERSONALS I CONSTITUCIONALS

b.2.1) Edat

La prevalença de CP en autòpsies arriba al 80% a la 8^a dècada³². Alguns autors havien suggerit que aquestos carcinomes "latents" representaven una forma innocua de CP, diferent de la malaltia clínica^{33, 34}. Estudis més recents indiquen que els carcinomes detectats en autòpsies o cistoprostatectomies radicals per càncer de bufeta no són inherentment diferents del CP que s'ha manifestat clínicament, sino que són senzillament més petits i millor diferenciats i, per tant, amb menys significació clínica^{35, 36}. El risc que un home de 50 anys desenvolupi al llarg de la seva vida un carcinoma detectable per autòpsia és del 42%, mentre que el risc de desenvolupar malaltia clínica o de morir per CP és del 10% i del 3% aproximadament³⁷.

El CP que es manifesta clínicament sol succeir entre la 6^a i 8^a dècada de la vida i menys del 1% dels casos es diagnostiquen en malalts de menys de 50 anys³⁸, tot i que un estudi recent reporta que un 4% dels casos es diagnostiquen en aquesta franja d'edat³⁹. Això es degut a que, amb el cribatge del PSA es detecten molts més casos en homes relativament joves, entre 40 i 55 anys, respecte a passades dècades. En les principals sèries històriques de casos publicades, l'edat mitjana en la qual el malalt ha manifestat CP clínicament es troba al voltant dels 65 anys⁴⁰⁻⁴³. De tota manera, casos de CP s'han documentat

fins i tot a la primera dècada de la vida i sovint s'han caracteritzat per ésser histològicament agressius ^{44, 45}. La duració del període asimptomàtic (o de latència) del CP s'estima en 11-12 anys de mitjana en individus de raça blanca i de 9-10 anys en individus de raça negra ⁴⁶.

Respecte a la PIN, un estudi autòpsic relativament recent ha mostrat que la PIN podia ja observar-se en homes a finals de la 2^a dècada de la vida. En aquest mateix estudi, es detectà carcinoma invasiu en aproximadament el 25% d'homes a la 3^a dècada de la vida ³⁴.

Un estudi recent, a partir de les dades obtingudes de l'estudi de Framingham, ha reportat un augment del risc de CP en els fills nascuts amb edats avançades del pare, però no de la mare ⁴⁷, malgrat que els estudis realitzats anteriorment amb aquestes variables han mostrat resultats conflictius ⁴⁸.

b.2.2) Altres factors

No s'han obtingut dades concluints fins a l'actualitat en relació amb el risc de CP per **factores antropomètrics** (alçada, pes, índex de massa corporal i altres) tot i la relació trobada amb altres càncers, com el de colon i mama ⁴⁹. S'ha proposat que les associacions observades entre els factors antropomètrics i el CP s'explicarien per una interacció amb els andrògens i, fins i tot, es proposa la relació amb factors de creixement insulínics (IGF) ⁵⁰.

El **pes al néixer** també ha estat motiu d'estudi. S'ha postulat la hipòtesi d'un possible paper del medi hormonal uterí durant l'embaràs en el desenvolupament de CP al cap d'unes dècades ⁵¹. Aquesta hipòtesi no ha estat confirmada posteriorment i no s'ha trobat una associació entre pes al néixer i incidència de CP, malgrat la possibilitat d'una associació positiva modesta entre el pes al néixer i el CP d'alt grau no es pot descartar ⁵².

B.3. FACTORS RACIALS

El risc és clarament diferent en els diversos grups ètnics. La mortalitat en homes afro-americans és més elevada que en homes caucàsics i excedeix àmpliament als homes de raça negra residents a l'Àfrica^{53, 54}. D'altra banda, els homes americans d'origen asiàtic tenen una mortalitat associada al càncer de pròstata més baixa respecte als caucàsics. Malgrat tot, les diferències en el comportament clínic entre els grups racials no han comportat un augment en el nombre de carcinomes associats a la raça negra detectats en estudis autòpsics⁵⁵.

Els estudis de migracions mostren que els homes japonesos i xinesos emigrats als EUA adquireixen els índexs de risc dels EUA en la 2^a-3^a generació. Els homes jamaicans descendents d'africans tenen un risc augmentat respecte als seus compatriotes⁵⁶. També, en un estudi antic es va evidenciar una disminució en la mortalitat a jueus residents a Nova York respecte a la població blanca no jueva⁵⁷.

S'han demostrat polimorfismes genètics associats amb grups racials. Així, variacions al·lèliques del gen del receptor de la vitamina D en afro-americans s'ha relacionat amb una incidència augmentada de CP avançat en aquest grup racial⁵⁸.

També s'ha proposat un paper en el risc de patir CP als trinucleòtids microsatèl·lits anomenats "seqüències de repetició CAG". Es troben situats a la regió N-terminal del receptor d'andrògens i que es creu que tenen un paper important en la regulació de la transcripció. S'ha comprovat una relació inversa entre el nombre de seqüències de repetició i el risc de patir CP, essent la raça negra on menys seqüències s'han trobat i la raça asiàtica on més se n'han trobat⁵⁹.

Un estudi recent ha corroborat que les diferències en el risc de CP entre la raça negra i blanca caldria atribuir-les a factors biològics, tot i que factors no biològics com l'estatus socio-econòmic podrien contribuir, però no explicar, les diferències d'incidència i supervivència en el CP entre ambdues races ⁶⁰.

B.4. FACTORS GENÈTICS

b.4.1) Història familiar

Actualment, disposem de suficient evidència pel que fa a l'existència de formes hereditàries/familiars amb inici de la malaltia en edats temperanes, curs agressiu i independència dels factors dietaris, ambientals i del grup ètnic al qual pertanyin ⁶¹. El CP hereditari es creu que representa el 9% del total de CP ⁶². Si un parent de primer grau està malalt de CP, llavors el risc relatiu augmenta al doble. Si són dos o més els parents afectats de CP, la probabilitat d'afectar-se de CP és de 5 a 11 cops més elevada ⁶³. En estudis anatomo-patològics de CP familiar, les neoplàsies foren de grau més baix que el seu homòleg esporàdic, sense observar cap altra diferència clínica ni patològica ⁶⁴.

Actualment, hi ha un gran interès en identificar marcadors moleculars a les famílies amb alt risc de desenvolupar CP. Mitjançant tècniques d'anàlisi de lligament genètic s'han identificat fins l'actualitat 4 loci amb susceptibilitat augmentada pel CP hereditari (logaritme de la probabilitat de lligament (LOD) > 3) ⁶⁵.

En la pàgina següent, la taula 4 resumeix les característiques d'aquests loci.

NOM DEL LOCUS	LOCALITZACIÓ DEL LOCUS	GENS CANDIDATS MÉS REPRESENTATIUS*
HPC1	1q24-25	ARG GPR52 TRK MR1 LAMB2
PCAP	1q42.2-43	PCTA1 RAB4 TWIK
CAPB	1p36	RIZ CMM1 p73 caspasa 9 MMP21, 22, 23 TNFR2 PAX7 PLA2G2A
HPCX	Xq27-28	ATP2A3 TMR2 LAGE1 LDOC1 MAGE ICAM CALT

Taula 4. Loci amb susceptibilitat augmentada per càncer de pròstata. Localització de cada locus i gens candidats més representatius.

* Font: OMIM (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchmap.html>, comprovada el 25 de Juliol de 2001)

b.4.2) Canvis genètics

La carcinogènesi prostàtica aparentment implica múltiples canvis genètics, que inclouen la pèrdua de seqüències genòmiques específiques que es poden associar amb la inactivació de gens supressors tumorals i el guany de algunes regions cromosòmiques específiques que poden estar associades amb l'activació d'oncògens. Les alteracions genètiques més freqüents a la PIN i al

carcinoma són el guany del cromosoma 7, particularment 7q31; la pèrdua de 8p i el guany de 8q; i la pèrdua de 10q, 16q i 18q ⁶⁶.

S'ha identificat un gen inductor de tumor prostàtic (PTI-1) que no s'expressa en la pròstata normal o en la hiperplàsia benigna prostàtica, però sí en el CP, en línes de cèl.lules canceroses i en el sèrum de pacients amb càncer ⁶⁷. També, molt recentment, s'ha identificat un nou gen anomenat PTOV-1 (de "prostate tumor overexpressed"), que es sobreexpressa en fases inicials i finals del carcinoma de pròstata ⁶⁸.

B.5. FACTORS HORMONALS

Les hormones testiculars són necessàries pel creixement i funcionament de la pròstata normal. L'administració de grans quantitats d'andrògens pot induir el CP tal com s'ha demostrat en diversos models animals ⁶⁹. A més, el CP aparentment no es desenvolupa en homes castrats després de la pubertat o en pseudohermafrodites amb una deficiència de la 5 α -reductasa i el CP, tant primari com metastàtic, sovint responen a castració quirúrgica, tractament amb estrògens externs i antiandrògens.

No s'han detectat anormalitats destacables en andrògens sèrics de malalts amb CP. En canvi, si s'han evidenciat concentracions augmentades de testosterona, dihidrotestosterona i androstendiona en teixits de càncer de pròstata comparats amb teixits de pròstata normal i a l'orina s'ha trobat un augment de la raó estrona/androsterona ⁷⁰. Un risc reduït de CP s'ha documentat en malalts cirròtics, potser pels nivells circulants elevats d'estrògens i disminuïts de testosterona ⁷¹.

A més, diversos gens implicats en el metabolisme dels andrògens com el gen que codifica el receptor d'andrògens (RA), membres de la família del gen del citocrom P450 i el gen SRD5A2, que codifica la 5 α -reductasa tipus II (enzim que converteix la testosterona en dihidrotestosterona), han estat implicats en l'etiologia del CP ⁷². Així, mutacions en el gen RA es troben en el

8% de CP clínicament detectables ⁷³. Més freqüentment s'observa l'amplificació del gen RA, que s'ha trobat en el 22% de les metàstasis en el CP hormono-refractari ⁷⁴. L'amplificació del gen RA sembla que succeeix en pacients que responen inicialment a la teràpia de deprivació d'andrògens, però recauen després. L'amplificació del gen RA i la sobreexpressió del tipus natiu de RA pot causar el creixement de cèl·lules tumorals independentment dels andrògens tot i el baix nivell d'andrògens circulants ⁷⁵.

També, com ja s'ha comentat, es considera que la disminució del nombre de seqüències de repetició CAG a la regió N-terminal del RA afavoreixen el risc de patir CP ⁵⁹.

B.6. FACTORS DIETÈTICS

De la mateixa manera que la incidència mundial del CP, els hàbits dietètics també varien considerablement a les diferents parts del món. Així, en els països asiàtics, caracteritzats per la seva baixa incidència del CP, la dieta és rica en fibra i soja i pobre en greixos animals. D'altra banda, als EUA, on la incidència de CP és alta, la dieta és abundant amb greixos animals. La relació entre dieta i CP és recolzada amb els estudis realitzats amb emigrants asiàtics als EUA, en els quals s'ha observat que, amb unes quantes generacions, la incidència de CP augmenta fins arribar als nivells de la població indígena. No obstant, cal tenir en compte que la majoria dels estudis realitzats sobre aquesta qüestió són de casos i controls i, en l'actualitat, estan començant a obtenir-se dades preliminars amb estudis prospectius ⁷⁶.

També la deficiència de vitamina D ha estat implicada. De fet, la Vitamina D s'uneix a receptors específics (VDRs) a les cèl·lules tumorals ⁷⁷ i, a més, el CP és més freqüent a països nòrdics respecte a l'equador i la incidència i mortalitat del CP s'ha relacionat inversament amb l'exposició a radiació ultraviolada, un factor necessari per a la síntesi de vitamina D.

Altres factors que podrien estar implicats són els retinoids, (particularment la vitamina A), carotenoids (particularment el licopè)⁷⁸, vitamina E, calci⁷⁹, seleni⁸⁰, fructosa, fitoestrògens i isoflavonoids⁸¹.

B.7. FACTORS MEDIAMBIENTALS I OCUPACIONALS

Existeix una més gran incidència de CP en països industrialitzats i un clar factor geogràfic, com ho demostra l'elevada incidència del CP als EUA i en països nòrdics europeus i una mínima incidència en països asiàtics; no obstant, aquesta incidència és equiparable a la de la població amb més gran risc geogràfic quan es produeixen migracions⁸², tal com s'ha comprovat en japonesos emigrats als EUA, en els quals la segona generació ja presenta una incidència similar a la de la població americana de raça blanca.

El risc de CP entre els grangers ha estat avaluat en diversos estudis epidemiològics als EUA i Europa^{83, 84}. Recents meta-anàlisis han reportat un risc augmentat de CP entre un 7 - 12 % als grangers⁸⁵. Altres professions que s'han associat a un augment del risc del CP són: treballadors del metall, mecànics, llauners, miners del carbó, químics, paperaires, fusters, tabacaires, treballadors del cadmi i cautxú; llibreters, executius i professors⁸⁶. D'aquests, només els compostos de cadmi i els pesticides s'han relacionat consistentment amb un augment del risc del CP⁸⁷⁻⁸⁹. Així, calen més estudis per identificar les exposicions específiques individuals relacionats amb l'augment del risc de CP en aquestes ocupacions i indústries.

B.8. MISCEL·LÀNIA

b.8.1) tabac

S'han realitzat uns bon grapat d'estudis epidemiològics fins a l'actualitat, per determinar el risc de CP associat al tabac. S'ha suggerit que el tabac podria influir en l'inici o progressió del CP, ja que: 1) algunes nitrosamines que indueixen el CP en ratolins s'han trobat en l'orina d'hommes

fumadors ⁹⁰ i 2) els fumadors tenen nivells elevats de testosterona i androstendiona sèriques, dos esteroids que poden contribuir a la progressió del CP ⁹¹. Malgrat totes aquestes troballes, l'hàbit tabàquic no és considerat generalment com a factor de risc de CP ^{92, 93}, tot i que alguns estudis han reportat una associació positiva ^{94, 95}. En altres estudis on s'ha estudiat la mortalitat només s'ha trobat una associació dèbil entre hàbit tabàquic i disminució de la supervivència per CP ^{96, 97}. Treballs publicats recentment han destacat una possible associació dèbil entre el nombre de cigarretes fumades i el risc de CP ⁹⁸, tot i que un altre també estudi ha indicat que no hi ha associació comprovada entre l'hàbit tabàquic i la incidència de CP ⁹⁹.

A més, cal afegir que la suplementació durant un llarg temps amb vitamina E en individus fumadors s'associava amb un augment en la incidència i mortalitat per CP ¹⁰⁰.

b.8.2) alcohol

Les dades epidemiològiques disponibles actualment no indiquen un paper etiològic en el CP de la ingesta d'alcohol ¹⁰¹, tot i l'existència d'estudis on s'ha trobat associació entre l'hàbit enòlic i el risc de patir un CP ¹⁰².

b.8.3) Vasectomia

La possibilitat d'una relació entre la vasectomia i el CP va ser inicialment estudiada de forma prospectiva l'any 1984 ¹⁰³, però no va ser motiu de controvèrsia fins a l'any 1990, quan es publicaren independentment dos estudis epidemiològics retrospectius, en els quals s'obtingueren resultats significatius ^{104, 105}. A partir d'aquest moment, diversos panels d'experts van estudiar a fons aquesta relació sense trobar resultats significatius addicionals que confirmessin aquesta hipòtesi. El gran desconeixement que encara es té del CP i la possibilitat que diversos factors de confusió hagin influït en aquests resultats podrien explicar la dèbil relació que s'ha observat en alguns estudis. Publicacions més recents sobre aquest tema recolzen l'absència de relació significativa entre vasectomia i CP ^{106, 107}, a excepció d'un de molt recent on es

refereix que la vasectomia sembla augmentar el risc de CP almenys 10 anys després de la cirurgia, sense poder excloure l'impacte de possibles biaixos en els individus vasectomitzats ¹⁰⁸.

b.8.4) altres factors

S'ha estudiat el possible paper d'altres factors com l'activitat física, l'estat civil, el nivell socio-econòmic, la diabetis, els papilomavirus i els herpesvirus ^{98, 109-122}, encara que els resultats obtinguts no han permès demostrar una associació clara amb el càncer de pròstata.

C. FACTORS PRONÒSTICS

Els factors pronòstics es poden definir com les característiques d'una malaltia que poden predir l'evolució d'aquesta en un individu determinat. Quan aquesta malaltia és el CP, molt pocs factors poden acomodar-se a aquesta definició i la majoria de les publicacions han adoptat una visió més àmplia del tema, incloent característiques del CP que defineixen la seva natura (marcadors biològics), prediuen la seva detecció futura, es relacionen amb el seu grau i/o estadi, o pronostiquen una resposta a la terapèutica a curt termini, essent aquest darrer el punt més important d'aquest apartat.

Deponent de l'evolució esperada, un pacient pot ser tractat amb intenció curativa, de vegades produint una morbiditat considerable iatrogènica o, ja d'entrada, amb una intenció paliativa, basada en mantenir la millor qualitat de vida del malalt. La tasca d'haver d'escollir el tractament òptim per cada malalt individual es difícil donades les dificultats per predir el curs d'aquest procés en cada malalt. Malgrat que la probabilitat de desenvolupar un CP evident clínicament és del 16% i la prevalença en estudis autòpsics arriba al 80%, la major part dels homes moren amb un CP més que per un CP, per la qual cosa és molt important poder distingir aquests tumors potencialment letals dels tumors relativament indolents. L'ús de marcadors pronòstics, per tant, pot ser crucial per identificar aquest subgrup de pacients amb CP

agressiu. Malauradament, en l'actualitat no hi han marcadors tumorals que puguin predir el curs clínic del CP de forma individual per a cada malalt i caldrà encara esforçar-se més en la tasca de trobar el marcador pronòstic ideal pel CP. Durant el mes de juny de 1999 i de forma separada, dos equips multidisciplinaris de metges (Col·legi Americà de Patòlegs (CAP) i Organització Mundial de la Salut (OMS)) es reuniren per avaluar les dades existents i per classificar els factors pronòstics associats al CP. Les dues reunions van aplicar el sistema de categorització de factors predictius introduït l'any 1994 per la CAP, amb resultats molt similars en ambdós casos.

<p>CATEGORIA I:</p> <p><i>Factors amb valor pronòstic demostrat basat en l'evidència de múltiples estudis publicats, els quals es recomana vagin inclosos en l'informe histopatològic rutinari.</i></p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Estadi TNM 2. Grau histològic (Patró de Gleason i grau nuclear de la OMS) 3. Estat dels marges quirúrgics 4. PSA perioperatori 5. Efectes patològics del tractament (OMS) 6. Localització anatòmica del càncer a la pròstata (OMS)
<p>CATEGORIA II:</p> <p><i>Factors amb possible valor pronòstic basat en l'evidència de múltiples estudis publicats, però que requereixen de més avaluació abans de recomanar el seu ús. També s'inclouen en aquesta categoria aquells factors dels quals hom recomana el seu ús com a marcadors pronòstics o diagnòstics tot i tenir dades incompletes.</i></p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ploïdia del DNA 2. Tipus histològic 3. Volum tumoral (tant en biòpsies per agulla com en peces de prostatectomia radical)
<p>CATEGORIA III:</p> <p><i>Factors amb alguna evidència científica que recolzi la seva adopció com a factors pronòstics o diagnòstics, però actualment encara no recomanats. També s'inclouen els factors de significat incert.</i></p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Antigen de membrana específic de pròstata 2. Altres tests sèrics (PSM, hK2, IGF, etc) 3. Invasió perineural 4. Invasió vascular / limfàtica 5. Densitat de microvasos 6. Factors estromals, com TGF-β, integrines, etc. 7. Marcadors de proliferació i apoptosi 8. Morfometria nuclear i anàlisi cariomètrica 9. Receptors androgènics 10. Marcadors neuroendocrins 11. Marcadors genètics 12. Altres factors

Taula 5. Classificació dels factors pronòstics del càncer de pròstata
(Reunions de la CAP i de la OMS (1999)) ^{123,124}

C.1. CATEGORIA I

c.1.1) Estadi tumoral

L'estadiatge correcte de la malaltia neoplàsica és la base fonamental per a la posterior elecció de l'estratègia terapèutica adequada i per a homogeneitzar criteris clínicopatològics amb la finalitat de tenir casuístiques comparables. Amb aquesta idea Whitmore va crear l'any 1956 el primer sistema de classificació del CP ¹²⁵, posteriorment modificat per Jewett l'any 1975 ¹²⁶.

El comitè de la OMS recomana que els patòlegs utilitzin la classificació TNM per informar les peces de prostatectomia radical ¹²³. Això inclou l'avaluació de la presència i quantitat d'extensió extraprostàtica. Tot i que no hi ha consens en el mètode per quantificar l'extensió extraprostàtica, hom recomana utilitzar com a metodologia les conclusions de la reunió de la UICC/AJCC de l'any 1995. Si la quantitat de tumor extraprostàtic es igual o menor a 2 camps de gran augment (x40), la quantitat d'extensió extraprostàtica s'ha de considerar focal. En cas de ser més gran de 2 camps es considera difús.

Classificació TNM (1997) ¹²⁷:

És la classificació més utilitzada, encara que només s'aplica als adenocarcinomes. El carcinoma de cèl.lules transicionals de pròstata es classifica com a tumor uretral. Són vàlides les mateixes classificacions per l'estadi clínic, TNM, i per l'estadi anatomopatològic, pT.pN.pM.

En la pàgina següent, es comenta aquesta classificació acuradament (Taula 6)

<p>ESTADI LOCAL: (T: tumor primari)</p>	<p><i>Tx: no es pot avaluar el tumor primari</i> <i>T1: tumor no evident clínicament, no palpable ni visible mitjançant tècniques d'imatge.</i> <i>T1a: tumor detectat com a troballa fortuïta en una extensió ≤ 5 % del teixit resecat.</i> <i>T1b: tumor detectat com a troballa fortuïta en una extensió > 5 % del teixit resecat.</i> <i>T1c: tumor identificat mitjançant una punció biòpsica o ecografia transrectal (per exemple com a conseqüència d'un PSA elevat).</i> <i>T2: tumor limitat a la pròstata (un tumor detectat en un o ambdós lòbuls mitjançant punció biòpsica, però no palpable ni visible per tècniques d'imatge, es classifica com T1c).</i> <i>T2a: tumor que afecta a un lòbul.</i> <i>T2b: tumor que afecta a ambdós lòbuls</i> <i>T3: tumor que s'extén a través de la càpsula prostàtica</i> <i>T3a: extensió extracapsular (unilateral o bilateral)</i> <i>T3b: invasió de la càpsula seminal</i> <i>T4: tumor fixat o que envaeix estructures adjacents diferents a les vesícules seminals, coll vesical, esfínter extern, recte, elevadors de l'anus i/o paret pèlvica.</i></p>
<p>AFECTACIÓ GANGLIONAR: (N: ganglis limfàtics regionals)</p>	<p><i>Nx: no es poden avaluar els ganglis limfàtics regionals.</i> <i>N0: no hi han metàstasis ganglionars regionals.</i> <i>N1: metàstasis als ganglis limfàtics regionals.</i></p>
<p>MALALTIA METASTÀSICA: (M: Metàstasi)</p>	<p><i>Mx: metàstasi distant que no pot ser avaluada</i> <i>M0: no hi ha metàstasi distant</i> <i>M1: metàstasi distant</i> <i>M1a: gangli(s) limfàtic(s) no regional(s).</i> <i>M1b: os(sos)</i> <i>M1c: altra localització</i></p>

Taula 6. Classificació TNM. 5ª edició (1997).

c.1.2) Grau histològic

Diversos sistemes de gradació del CP són ampliament utilitzats en l'actualitat. La utilitat d'aquests sistemes depèn de la seva reproductibilitat i validesa.

La OMS recomana que els patòlegs informin del patró de Gleason i el grau nuclear de la OMS i que també incloguin la proporció de càncer d'alt grau (Gleason 4 i 5) ¹²³. El grau nuclear es basa en el grau nuclear predominant, però també té valor el grau nuclear màxim en cas de no ser predominant.

D'altra banda, el CAP encara que reconeix la utilitat del grau nuclear de la OMS, recomana com a sistema estàndard, el sistema de Gleason ¹²⁴.

A més del sistema de Gleason i del sistema de la OMS, existeixen altres classificacions per determinar el grau histològic com són la de Broders (1926) ¹²⁸, Gaeta (1981) i MD Anderson (1982) ⁷⁰.

a) Sistema de Gleason:

És el sistema més difós en l'actualitat. Es tracta d'un sistema avaluat i desenvolupat pel Veteran Administration Cooperative Urological Research Group (VACURG). Aquest grup estudià el CP en un estudi clínic prospectiu, controlat i aleatoritzat en més de 4.000 pacients de 20 hospitals de la Veterans Administration (VA) als EUA, des del 1960 al 1975. Aquest sistema es va publicar a l'any 1966 ¹²⁹ i es va redefinir als anys 1974 ¹³⁰ i 1977 ¹³¹. Els patrons histològics observats es categoritzaren per l'extensió de la diferenciació glandular i el patró de creixement del tumor en l'estroma prostàtic i s'obteniren 5 graus. El grau 3 es divideix en 3A, 3B i 3C, i els graus 4 i 5 es divideixen en 4A i 4B, 5A i 5B, respectivament.

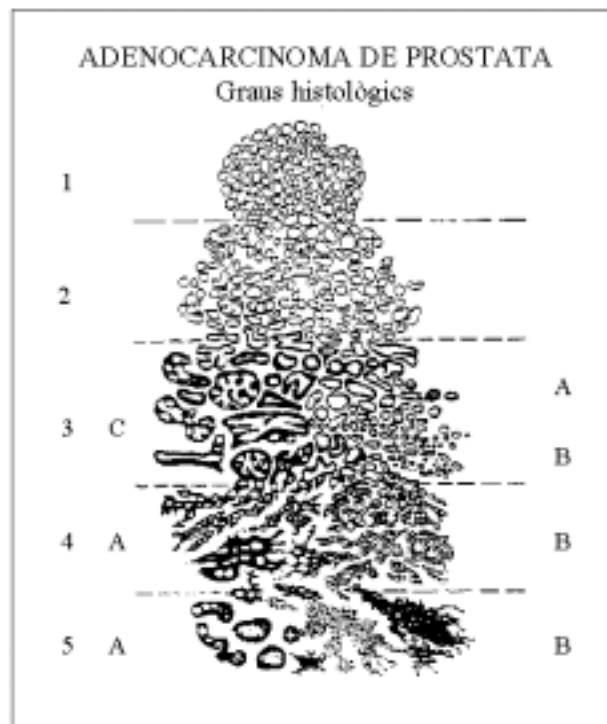


Fig 2. Esquema simplificat del sistema de gradació de Gleason per a l'adenocarcinoma de pròstata. Modificat de Gleason DF¹³¹.

Gleason, corroborat posteriorment per altres investigadors, s'adonà que el CP contenia dos o més patrons arquitectònics recognoscibles en més del 50 % dels casos. El nombre de patrons també sembla augmentar en relació amb l'increment de volum tumoral. En casos amb múltiples patrons, el reconeixement d'un carcinoma d'alt grau entre un carcinoma moderadament o ben diferenciat és una troballa força freqüent (53 % dels casos)¹³².

Per informar d'aquesta heterogeneïtat, Gleason assignà un primer grau al patró "dominant" (el més freqüentment observat) i un grau secundari al següent grau més freqüent, amb la particularitat que aquest últim havia de comprendre almenys el 5 % del tumor. Ambdós graus foren qualificats com un

nombre enter i van ser sumats, obtenint-se valors compresos entre 2 i 10, donant lloc al patró combinat ("score") de Gleason. Recentment, s'han publicat dades sobre el possible valor pronòstic, en casos de CP ben diferenciats, de la presència d'un grau terciari de Gleason 4 ó 5, tot i que aquestes dades requereixen estudis que ho confirmin ¹³³. Com s'ha comentat fins ara, el sistema de Gleason pren en compte l'heterogeneïtat tumoral histològica del CP. Aquesta característica, així com la multifocalitat del tumor, poden induir a errors del mostreig quan el grau s'estableix a partir de biòpsies per agulla ¹³⁴. Fins i tot, no s'hauria de diagnosticar amb una biòpsia per agulla un CP amb un grau de Gleason entre 2 i 4 ¹³⁵. A més, el poder pronòstic del patró combinat de Gleason és més gran en tumors amb el patró més baix (2-4) i el més alt (8-10). Malauradament, la majoria dels tumors tenen un estadi intermedi (5-7) i mostren agressivitat biològica heterogènia. La puntuació de Gleason no serveix per discriminar entre les formes indolents i les formes agressives del CP. A més, la variabilitat inter- i intra-observador dificulta l'ús del patró combinat de Gleason com a indicador pronòstic en pacients amb CP.

b) Sistema de Mostofi (OMS):

Descrit l'any 1975 ¹³⁶, subdivideix el CP en base a la diferenciació glandular i l'anaplàsia nuclear.

La diferenciació glandular es classifica des d'un grau 0, on el 100% de les glàndules es troba diferenciat, fins a un grau 4, caracteritzat per un component tumoral pobrement diferenciat que constitueix més del 25% del total tumoral. L'anaplàsia nuclear va des d'un grau 1, on els canvis nuclears són lleus, fins a un grau 3, amb marcats canvis nuclears.

La combinació d'aquests dos graus en una mesura única indica un pitjor pronòstic. Una escala additiva que resulta de sumar ambdós graus, amb valors compresos entre 1 i 7 amb totes les categories representades, ha estat suggerit.

c.1.3) Estat dels marges quirúrgics

La OMS ¹²³ recomana que s'informi de la presència, localització i extensió de tots els marges quirúrgics. No obstant, reconeix la mancança d'acord per trobar un mètode que permeti quantificar el càncer en aquestes localitzacions. També recomana informar de la presència de glàndules prostàtiques benignes en el marge de resecció per tal d'alertar als clínics de la possible presència de teixit residual productor de PSA després de la cirurgia.

El CAP ¹²⁴ assenyala la controvèrsia existent sobre quin és el millor mètode per examinar els marges. La definició de "marge positiu" és variable i casos amb marges positius són erròniament inclosos en la categoria pT3. És important localitzar exactament el marge positiu, donat que l'impacte de l'apex pel seu compte té un impacte negatiu menor que en altres localitzacions. També és important detectar el marge positiu en el lloc d'afectació extraprostàtica pT3a respecte a la resta. Finalment, es destaca que la longitud del marge afectat pot ser important. Cal destacar que s'ha de reportar sempre en l'informe anatomo-patològic i té un valor pronòstic contrastat, encara que la localització i el mètode per mesurar la longitud afectada romanen qüestions obertes.

c.1.4) PSA

L'antigen específic prostàtic (PSA) es considera actualment el marcador més important per a la detecció precoç i el cribatge del CP. Es una serina-proteasa identificada l'any 1979 ¹³⁷ i seqüenciada l'any 1988 ¹³⁸, malgrat que des de l'any 1966 a l'any 1978 es van descriure proteïnes del líquid seminal que podrien correspondre realment al PSA ¹³⁹. És secretada per les cèl·lules luminals dels àcins i conductes prostàtics al líquid seminal. La seva funció fisiològica és liquar el gel seminal mitjançant la lisi de la seminogelina I i II en fragments solubles. També s'ha detectat PSA d'origen no prostàtic i, fins i tot, al sèrum de les dones, encara que els nivells observats han estat molt baixos ¹⁴⁰. Per tant, l'especificitat del PSA per la pròstata ha estat refusada i,

actualment, s'estan estudiant nous marcadors específics de la pròstata, com la prostateïna ¹⁴¹.

Tanmateix, molts estudis han reportat la utilitat clínica dels nivells de PSA per establir la probabilitat de la disseminació extrapròstica i a ganglis limfàtics del CP, en especial quan s'associa amb altres paràmetres com el grau tumoral, l'examen per tacte rectal i les troballes ecogràfiques. També s'ha destacat el seu paper en la monitorització dels pacients de CP després del seu diagnòstic inicial o després del tractament ¹⁴².

La major part dels CP presenten uns nivells sèrics de PSA superiors a 4,0 ng/ml. Això ha fet que s'hagi considerat aquest valor, de forma arbitrària, com a límit superior del PSA "normal" ¹⁴³. Malgrat això, el PSA pot ser superior a 4,0 ng/ml en diverses situacions de benignitat, especialment en la hiperplàsia benigna prostàtica, tot i que també es pot observar un augment del PSA en la prostatitis, l'infart o la isquèmia prostàtica, la retenció urinària aguda; la realització de biòpsia prostàtica, massatge prostàtic i manipulació uretral; així com a l'ejaculació ¹⁴².

Es considera actualment que la PIN no augmenta massa els nivells de PSA sèric. Quan la biòpsia prostàtica d'un pacient és diagnosticada de PIN i aquesta troballa s'associa a un PSA elevat, cal sospitar que aquest augment és degut a CP invasiu i no detectat amb la biòpsia, per la qual cosa seria recomanable repetir la biòpsia. Aquesta asseveració té la seva lògica si es considera que la PIN, com el seu nom indica, és intraepitelial i, per tant, el PSA sintetitzat per les cèl·lules luminals aniria a parar al líquid seminal més que a l'estroma o als vasos sanguinis ¹⁴².

Amb tot això, el PSA sèric mostra una poca sensibilitat i especificitat pel CP. Per intentar solucionar aquest problema, s'han calculat diversos índexs relacionats amb el PSA sèric, com la densitat del PSA, la velocitat del PSA i, especialment, el percentatge de PSA lliure.

Actualment la utilitat del PSA lliure es troba, quan s'utilitza conjuntament amb el valor del PSA total, en la distinció dels pacients amb CP dels que estan afectats de malalties benignes. El CAP ¹²⁴ assenyala que les mesures derivades del PSA (com el percentatge de PSA lliure) encara es consideren factors pronòstics de categoria III, donat que la informació reportada fins l'actualitat mostra importants variacions.

c.1.5) Localització del càncer dins de la pròstata (només OMS)

La OMS ¹²³ reconeix que el CP és freqüentment multifocal i bilateral. Aquests focus cancerosos probablement són genotípicament i fenotípicament diferents, respecte al seu comportament, incloent la seva resposta terapèutica. Per tant, recomana que en les mostres de biòpsia es detalli acuradament la localització anatòmica, per poder incloure en l'informe l'àrea anatòmica on es troba localitzat el càncer. També s'hauria d'incloure, quan fos possible, la localització anatòmica del càncer en les peces de prostatectomia radical.

C.2. CATEGORIA II

c.2.1) Contingut d'ADN (ploïdia)

Diversos estudis han suggerit que l'aneuploidia de l'ADN en peces de prostatectomia radical i biòpsies per agulla es correlaciona amb progressió, metàstasi i mal pronòstic ^{144, 145}. Tot i així, el seu paper clínic és encara motiu de discussió.

El CAP ¹²⁴ especifica que nombrosos estudis suggereixen que l'anàlisi de la ploïdia afegeix informació pronòstica addicional, malgrat que no es pot garantir encara el seu ús rutinari donat que no hi ha consens en el mètode estandard a utilitzar i perquè la mida petita de molts tumors exclou la utilització de l'únic mètode estandaritzat existent (citometria de flux). Malgrat tot, s'han obtingut resultats interessants aplicant la tècnica de FISH a l'estudi de la ploïdia al càncer de pròstata ^{146, 147}. Tanmateix, calen més estudis,

incloent la possibilitat d'aplicar tècniques d'anàlisi d'imatge en el cas que la ploïdia de l'ADN adquireixi utilitat clínica.

c.2.2) Volum tumoral a les biòpsies per agulla

El CAP ¹²⁴ assenyala que s'han realitzat nombroses aproximacions per reportar aquesta dada, entre les quals s'inclouen: nombre de cilindres positius (en anglès, "cores"), percentatge de cilindres afectats, longitud total (mm) de tumor en tots els cilindres i longitud màxima única (mm) de tumor en qualsevol cilindre i percentatge total de biòpsies afectades (àrea de la superfície afectada). Existeix variabilitat sobre com contar els "cores" i com valorar els casos fragmentats, així sobre com contar 2 focus independents de tumor en la mateixa biòpsia (dubte en si cal incloure teixit no tumoral existent entre els dos focus)

c.2.3) Volum tumoral en la peça de prostatectomia

El CAP ¹²⁴ especifica que no es tracta d'un mètode acceptat de quantificació, donat que el tallat parcial enfront del tallat total continua essent una qüestió no resolta. No obstant, recomana que l'extensió intraprostàtica del tumor ha de ser avaluada per algun mètode estàndard, per tal de reportar el percentatge de tumor en la mostra analitzada. Aquesta dada especifica hauria de ser inclosa en l'informe anatomopatològic.

c.2.4) Subtipus histològics de càncer

El CAP assenyala que alguns subtipus histològics ¹⁴⁸ (cèl.lules petites, ductal, mucinós) han de ser reportats, donada la seva implicació pronòstica i terapèutica significativa. Comprenen menys del 10% dels casos de CP.

La taula 7, a les pàgines següents, resum les característiques més destacables dels diversos subtipus histològics del carcinoma de pròstata.

TIPUS HISTOLÒGIC	CARACTERÍSTIQUES HISTOLÒGIQUES	CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques
ADENOCARCINOMA DUCTAL ¹⁴⁹	<i>Proliferació epitelial florida, papil·lar, cribiforme o sòlida en grans conductes periuretrals prostàtics. Pot retenir cèl·lules basals detectables amb la citoqueratina 34βE12</i> ¹⁵⁰ .	<i>Generalment presenta un estadi avançat sense un nivell de PSA elevat. Curs més agressiu. Controvertit com a entitat neoplàsica</i> ¹⁵¹ .
CARCINOMA INDIFERENCIAT DE CÈL·LULA PETITA <i>(neuroendocrí d'alt grau)</i>	<i>Idèntic a la seva contrapartida al pulmó o altres localitzacions.</i>	<i>Pronòstic molt dolent, amb una mitjana de supervivència inferior a 2 anys. Es pot associar a síndromes paraneoplàsiques com la síndrome de Cushing, secreció inapropiada d'ADH i altres.</i>
CARCINOMA MUCINÓS <i>(col·loide)</i>	<i>Almenys el 25% del tumor es compon de mucina extracel·lular, alguns amb mucina extraglandular, i també presenta cèl·lules tumorals soltes o agrupades dins de llacs de mucina</i> ¹⁵² . Una variant rara inclou el carcinoma de pròstata de tipus colònic, però aquest patró és freqüentment motivat per la disseminació contigua d'un càncer de recte.	<i>Similar o lleugerament pitjor que l'adenocarcinoma convencional.</i>
CARCINOMA DE CÈL·LULES EN ANELL DE SEGELL	<i>Característiques típiques d'un carcinoma de cèl·lules en anell de segell convencional, amb cèl·lules tumorals que mostren immunoreactivitat per fosfatasa àcida prostàtica (PAP) i PSA. La mucina pot no estar present. Freqüentment es troba barrejat amb adenocarcinoma acinar típic.</i>	<i>Molt rar en la seva forma pura, pronòstic molt dolent.</i>
CARCINOMA ESCAMÓS	<i>Es manifesta principalment com a carcinoma adenoescamós mixt, però formes pures de carcinoma de cèl·lules escamoses amb característiques típiques de malignitat es poden observar.</i>	<i>El carcinoma adenoescamós mixt i el carcinoma de cèl·lules escamoses pur pot aparèixer després de teràpia hormonal o radioteràpia per un adenocarcinoma acinar típic. El carcinoma escamós pur és molt estrany i té molt mal pronòstic, essent refractari al tractament de privació hormonal.</i>

<p>CARCINOMA SARCOMATOIDE</p>	<p><i>Carcinoma de cèl.lules fusiformes indiferenciades, usualment amb carcinoma acinar típic. La immunohistoquímica pot ser útil, mostrant almenys una positivitat focal per PSA, PAP, queratines i altres marcadors epitelials. També pot presentar elements heteròlegs, i es pot considerar com a carcinosarcoma, quan mostra diferenciació mesenquimal a nivell morfològic, immunohistoquímic o ultraestructural ^{153, 154}.</i></p>	<p><i>Pronòstic molt dolent amb mort abans de 48 mesos.</i></p>
<p>CARCINOMA DE CÈL.LULES TRANSICIONALS</p>	<p><i>Pot ser primari de pròstata o de la uretra prostàtica, però generalment es deu a afectació secundària per un carcinoma de bufeta. El tumor pot ser "in situ" o invasiu a la pròstata. Cal buscar també disseminació pagetoide, que rarament es pot estendre al llarg dels conductes ejaculadors a través de la pròstata cap a les vesícules seminals.</i></p>	<p><i>Pronòstic desfavorable, important distingir de l'adenocarcinoma, donat que és refractari al tractament de deprivació hormonal.</i></p>
<p>CARCINOMA ADENOIDE QUÍSTIC o de cèl.lules basals</p>	<p><i>Nius de cèl.lules basaloides rodones u ovals, freqüentment amb un patró cribiforme. Buscar mucina luminal i material eosinòfil semblant a membranes basals.</i></p>	<p><i>Molt rar, amb metàstasis o mort no definides.</i></p>
<p>CARCINOMA DE TIPUS LIMFOEPITELIOMA</p>	<p><i>Illes de glàndules molt estretament agrupades enmig d'un estroma limfoide dens.</i></p>	<p><i>Només 2 casos reportats, amb un significat pronòstic incert.</i></p>
<p>CARCINOMA PSEUDOHIPERPLÀSIC</p>	<p><i>Papil·les, glàndules atípiques grans, capa basal absent, ramificacions, cossos amilacis, engrandiment nuclear i nuclèols. Poc freqüentment associat a mitosi, secreció de mucina, PIN adjacent i invasió perineural ¹⁵⁵.</i></p>	<p><i>No establertes. Recentment descrit.</i></p>

Taula 7. Subtipus histològics del càncer de pròstata de tipus no acinar

C.3. CATEGORIA III

c.3.1) Invasió perineural

La invasió perineural és freqüent en adenocarcinomes, trobant-se fins en un 38% de les biòpsies ¹⁵⁶. Juntament amb la fibroplàsia mucinosa i les

glomerulacions, constitueix una troballa histològica diagnòstica de CP a les biòpsies per agulla ¹⁵⁷. De tota manera, no és patognomònica, donat que es pot veure en àcins benignes, encara que infreqüentment ¹⁵⁸. La utilitat predictiva de la invasió perineural a la invasió extraprostàtica és molt limitada. Malgrat tot això, recentment s'ha suggerit que la presència d'invasió perineural en mostres de biòpsia amb agulla pot tenir un paper predictor independent de l'evolució de la malaltia un cop realitzada la prostatectomia radical en càncers localitzats, independentment dels nivells de PSA ¹⁵⁹.

c.3.2) Micrometàstasis a ganglis limfàtics

El CAP ¹²⁴ destaca que existeixen diferències en els mètodes utilitzats per la seva avaluació (llevat de l'estudi histològic de rutina), incloent immunohistoquímica i mètodes moleculars. Actualment, no hi ha cap acord en la definició de micrometàstasi al CP i la significació clínica de petits focus de càncer en els ganglis limfàtics és incerta. Hom considera com a micrometàstasi una metàstasi confirmada histològicament igual o menor a 2 mm.

c.3.3) Diferenciació neuroendocrina

Les cèl.lules neuroendocrines són components dels conductes prostàtics i àcins, així com del CP amb diferenciació neuroendocrina. Formen part del sistema regulador neuroendocrí difús i àmpliament dispersat, conegut com cèl.lules endocrines-paracrines. A la pròstata humana, s'han identificat subpoblacions de cèl.lules neuroendocrines basant-se en la morfologia o els seus productes de secreció. La majoria de les cèl.lules neuroendocrines de la pròstata contenen serotonina, cromogranina A i altres marcadors neuroendocrins que no s'expressen coherentment. Basant-se en la funció en altres òrgans, les cèl.lules neuroendocrines de la pròstata estan probablement implicades en la regulació del creixement, diferenciació i funcions secretores. En l'home, el CP exhibeix diferenciació neuroendocrina com a: 1) carcinoma neuroendocrí de cèl.lula petita (infreqüent), 2) càncer "carcinoide-like" (rar) i 3) CP convencional amb diferenciació neuroendocrina focal. El significat d'aquesta diferenciació neuroendocrina en el CP és incert.

Recents investigacions que han plantejat la relació entre diferenciació neuroendocrina i pronòstic han generat resultats contradictoris i controvertits. Alguns estudis han mostrat una correlació amb altres factors de risc coneguts, com el grau i l'estadi, mentre d'altres, entre els quals s'inclouen els estudis publicats més recentment, mostren un significat pronòstic independent de la diferenciació neuroendocrina i, fins i tot, n'hi han d'altres que no mostren cap correlació ¹⁶⁰.

Les cèl·lules neuroendocrines no tenen receptors androgènics, per tant no hi han alteracions en la diferenciació neuroendocrina després de la teràpia hormonal, fet que pot comportar resistència a aquest tipus de tractament.

c.3.4) Densitat de microvasos

Fins a l'actualitat, s'han realitzat alguns estudis per investigar la relació entre la densitat microvascular (MVD) i l'estadi tumoral ^{161, 162}. La major part dels estudis realitzats en prostatectomies han trobat una correlació positiva entre MVD i l'estadi tumoral, encara que hi han excepcions ¹⁶³⁻¹⁶⁶. En canvi, en biòpsies, el MVD ha mostrat una correlació amb prostatectomies parellades i ha estat un factor predictiu independent de l'extensió extraprostàtica ^{162, 165}. Actualment es troba acceptat el potencial predictiu de la MVD, pel que fa a la recurrència i la supervivència ^{166, 167}.

c.3.5) Morfometria nuclear

La mesura de l'arrodoniment nuclear, mida, forma i textura dels nuclis, nombre, mida i forma dels nuclèols i l'àrea nuclear poden tenir un valor pronòstic en pacients amb CP ¹⁶⁸. No obstant, dificultats en relació amb les tècniques d'anàlisi d'imatge, processament de mostres i reproductibilitat dels resultats romanen com a assumpte principal i han evitat que l'avaluació de la morfometria nuclear es consideri predictiva de CP.

D. MECANISMES MOLECULARS DE PROGRESSIÓ DEL CÀNCER

El càncer és una malaltia en la qual es produeix una incessant expansió, habitualment clonal, de cèl.lules somàtiques que envaeix, trastorna i erosiona el teixit normal fins causar la seva mort. A cada càncer succeeixen un nombre limitat d'esdeveniments "crítics" que afavoreixen l'expansió incontrolada i la invasió per part de les cèl.lules tumorals. Un d'aquests esdeveniments és la desregulació de la proliferació cel.lular que, juntament amb l'obligada supressió de l'apoptosi compensadora, estableix un entorn adequat que recolza la progressió de la neoplàsia. Amb posterioritat, l'establiment d'un microambient entre les cèl.lules tumorals i l'estroma permet l'intercanvi d'enzims i citoquines, les quals modifiquen la matriu extracel.lular, estimulants la migració i promovent la proliferació i supervivència de les cèl.lules tumorals.

Tot seguit, s'analitzarà el paper del cicle cel.lular en la regulació de la proliferació cel.lular, el desencadenament i la regulació de l'apoptosi i els mecanismes d'invasió tissular. En el capítol posterior es comentarà com aquestos esdeveniments intervenen en l'aparició i progressió del càncer de pròstata.

D.1. EL CICLE DE DIVISIÓ CEL.LULAR

Les cèl.lules disposen d'un alt nivell d'estructuració i han d'adaptar-se a les necessitats específiques de l'organisme. La majoria de les cèl.lules han de mantenir-se en un estat de repòs on no es produeix la seva diferenciació. Les cèl.lules obeeixen doncs, senyals que els impedeixen de dividir-se. Aquests senyals no provenen només de factors nutricionals, sinó també de factors solubles, de la propiu matriu extracel.lular, factors d'adhesió i d'interaccions entre cèl.lules veïnes. Només quan s'eliminin aquestes

restriccions i les cèl.lules rebin senyals de proliferació específics podran iniciar un nou cicle de divisió ¹⁶⁹.

Les cèl.lules es divideixen per duplicació del seu ADN i les seves estructures, i posteriorment es reparteixen els continguts citoplasmàtics i els diferents orgànuls entre dues cèl.lules filles idèntiques. Aquesta duplicació té dues finalitats: en primer lloc, es requereixen moltes divisions per a la formació d'un nou individu, però alhora, quan arriba a l'estat adult, la pròpia homeòstasi obliga les cèl.lules a estar dividint-se constantment i ordenadament per tal de substituir les cèl.lules que van morint al llarg del temps. Aquest procés s'anomena **cicle de divisió cel.lular**, o més freqüentment **cicle cel.lular** i es pot definir com el procés universal mitjançant el qual les cèl.lules es reproduïxen i serveix com a base per al creixement i desenvolupament de tots els organismes vivents ¹⁷⁰.

d.1.1) Fases del cicle cel.lular

El cicle cel.lular es divideix en 4 fases (G1, S, G2, M), a més d'una fase de repòs (G0). Les més característiques són les fases de síntesi d'ADN (anomenada fase S) i mitosi (anomenada fase M). A la fase S es duplica el contingut total d'ADN dels cromosomes. A la fase M és on es produeix la partició en dues de la cèl.lula de forma que cadascuna de les cèl.lules filles rebí el mateix contingut d'ADN que la cèl.lula progenitora ¹⁷¹.

A més de les etapes S i M, es poden definir unes etapes funcionals que es produeixen entre aquestes dues. La fase G₁ (de gap1) és l'interval temporal en què les cèl.lules es preparen per a la fase S. Correspon a l'interval entre la mitosi prèvia i la nova replicació cromosòmica. El període entre la síntesi d'ADN i l'inici de la fase de mitosi i divisió cel.lular s'anomena fase G₂ (de gap2). Aquestes fases G₁ i G₂ són fases en què la cèl.lula s'assegura que les etapes anteriors han estat completades satisfactòriament i que, per tant, sigui el moment adequat de poder passar a la fase següent dins de l'esquema ordenat del cicle. Per tant, els principals punts de regulació i control d'aquest

procés es troben localitzats a les transicions entre les fases G_1 i S i la fase G_2 i M¹⁷².

Les cèl·lules que es troben a G_1 , si encara no estan compromeses en la realització d'un nou cicle de divisió, poden passar a un estat, anomenat G_0 (de gap 0), en què poden quedar en repòs, fora del cicle, durant un temps indefinit. Aquest estat pot ser induït per la manca de factors proliferatius o bé per l'absència de nutrients i es caracteritza per una disminució generalitzada del metabolisme cel·lular amb disminució de la síntesi de proteïnes i d'ARN. Les cèl·lules també poden quedar en repòs a la fase G_2 , esperant un senyal que les indueixi a continuar la mitosi (o la meiosi, com en el cas dels oòcits). L'entrada i sortida d'aquest estat de quiescència estarà controlada per les característiques intrínseques de cada tipus cel·lular i una sèrie de factors externs com són la disponibilitat de nutrients, la mida cel·lular i la relació existent entre factors de creixement i proliferació amb factors de tipus inhibidor. Donat que el temps necessari per progressar per les altres fases del cicle és breu i constant, l'estona en la qual es troben les cèl·lules a G_0 i G_1 condiciona les diferències en la durada del cicle cel·lular entre els diferents tipus cel·lulars, i que el temps necessari per a una cèl·lula per entrar en la fase S sigui superior si prové d'un estat G_0 (G_0 -S) respecte a si prové d'un estat G_1 (G_1 -S), atès que requereix un espai de temps addicional per posar en marxa tota la seva maquinària metabòlica i transcripcional¹⁷³.

d.1.2) Control del cicle cel·lular

La coordinació entre l'ordre i la temporalitat en la seqüència de processos que constitueixen el cicle cel·lular és un factor clau per a la correcta transmissió de la informació genètica. Per aquest motiu, la cèl·lula ha d'assegurar-se que un cert pas del cicle no s'iniciï fins que els passos anteriors no s'hagin completat d'una forma eficient i correcta. Aquesta coordinació s'efectua en els anomenats punts de control, en els quals diversos mecanismes bioquímics determinen la capacitat de progressar en el cicle. Els dos punts de control més coneguts es troben a les transicions G_1 -S i G_2 -M. A la transició G_1 -S es troba el punt de control anomenat "punt de restricció", en el

qual la cèl.lula queda compromesa a replicar el seu contingut d'ADN i a completar un cicle complet de divisió ¹⁷⁴. També en aquest punt s'integren senyals positius i negatius ja siguin interns o externs. Un cop traspasat aquest punt, en condicions normals, la cèl.lula travessarà la fase S i també les fases G₂ i M. Arribats en aquest punt, un mecanisme binari de tot o res és generat a partir de l'acumulació de senyals de tipus continu. Quan aquestos senyals arriben a un nivell crític s'inicia irreversiblement tot el procés. Un cop iniciada la replicació, la cèl.lula ha de completar-la un sol cop i no ha d'intentar dividir-se fins que aquesta no s'hagi acabat. A la transició G₂-M la cèl.lula té l'oportunitat de controlar si la replicació de l'ADN s'ha completat sense problemes i l'ADN duplicat no es troba danyat.

El sistema de control del cicle cel.lular està fonamentat en l'acció coordinada de dos tipus de proteïnes. Les primeres són les proteïna-quinases dependents de ciclins (Cdk). Aquestes proteïna-quinases controlen les successives etapes del cicle mitjançant la fosforilació d'altres proteïnes en residus de serina i treonina. Entre d'altres proteïnes, aquestes quinases fosforilen factors de transcripció, histones, lamines, etc. La seva activitat depèn de la seva associació amb una segona família de proteïnes, les anomenades ciclins. Aquesta nomenclatura es deu a que s'acumulen per síntesi "de novo" durant la interfase i es destrueixen sobtadament per degradació proteolítica durant la fase M. La formació de complexos entre diferents Cdk i diferents ciclins, la seva activació, la unió de diferents proteïnes amb caracter inhibidor, i la dissociació i degradació de les subunitats de ciclina són els punts que governen i regulen tots els diferents punts de control al llarg del cicle ¹⁷¹.

Entre els pocs substrats de les Cdk de la fase G₁ coneguts actualment destaca la proteïna del gen del retinoblastoma (pRb/p105) i les proteïnes relacionades p107 i p130. El gen del retinoblastoma és el prototip de gen supressor tumoral; la seva pèrdua condueix a la proliferació cel.lular incontrolada i a la transformació neoplàsica. Les proteïnes pRb/p105, p107 i p130 actuen al cicle cel.lular de forma repressiva, per la unió i conseqüent inactivació dels factors de transcripció E2F. L'activitat dels factors E2F és necessària per a l'expressió de gens involucrats en la replicació de l'ADN i la

transició G₁-S. La pRb/p105 només pot unir-se i inactivar els factors E2F quan es troba en un estat hipofosforilat. La fosforilació de pRb/p105 per complexos ciclina-cdk al final de la fase G₁ allibera l'E2F permetent que la cèl.lula avanci cap a la fase S. Al contrari, si pRb/p105 és mantingut en un estat hipofosforilat, ja sigui pels propis factors antiproliferatius de l'organisme o per un medi ectòpic, el cicle és bloquejat al final de G₁¹⁷⁵.

Variacions en la relació entre els nivells de les proteïnes inhibidores de ciclina/cdk (CKIs) i els nivells dels diferents complexos ciclina-cdk regulen el pas a través del punt de restricció. Els mitògens indueixen l'expressió de les ciclines i, ocasionalment, de les pròpies cdk, mentre disminueixen l'expressió dels inhibidors. En el cas contrari, els factors antiproliferatius indueixen els efectes oposats, generalment sense interferències entre les respectives vies de transducció de senyals¹⁷⁶.

d.1.3) Regulació de l'activitat de les quinases depenents de ciclines

Molts aspectes de la biologia dels complexos ciclina-cdk romanen encara poc entesos. La seva activitat es pot regular a nombrosos nivells i actualment es coneixen almenys 6 mecanismes implicats¹⁷⁷:

(a) la síntesi de ciclines es produeix en determinats moments del cicle. Així, l'expressió de ciclines D va associada a la presència o no de factors de creixement mitogènics¹⁷⁸, (b) regulació activa de la degradació de ciclines. Aquesta "maquinària" anàloga al complex promotor de l'anafase (el qual regula la mitosi) és la diana de diverses proteïnes induint la seva degradació mitjançant el sistema ubiquitina-proteasoma, (c) necessitat de la unió a una cdk, tal com s'ha explicat prèviament, (d) activació del complex ciclina-cdk per una quinasa activadora de ciclina, la qual fosforila una treonina a la cdk¹⁷⁹, (e) desfosforilació d'aminoàcids addicionals mitjançant la inhibició de determinades quinases (conegudes com wee1/myt1) i activant algunes fosfatases (conegudes com cdc25A, B i C)¹⁷⁷ i (f) interacció amb altres proteïnes conegudes com inhibidores de ciclina-cdk (CKIs).

Proteïnes inhibidores de ciclina-cdk (CKIs):

Les CKIs són unes proteïnes que, un cop activades, impedeixen que els complexos ciclina-cdk fosforil·lin una gran varietat de substàncies implicades tant en la transició G_1 -S com a la G_2 -M, inhibint la progressió del cicle cel·lular.

S'han identificat dos grups:

1) la família dels inhibidors anomenada *Ink4* (per inhibidors de *cdk4*) inclou $p16^{Ink4A}$, $p15^{Ink4B}$, $p18^{Ink4C}$ i $p19^{Ink4D}$ (on els números indiquen el seu pes molecular aparent). Es caracteritzen per presentar a la seva estructura motius similars a l'anquirina. Aquests motius estructurals són importants per a la unió i inhibició que efectuen sobre *cdk4* i *cdk6*. La seva unió impedeix la formació de complexos actius de les quinases amb les corresponents ciclins D¹⁷⁶.

2) la família d'inhibidors relacionats amb *p21* inclou tres membres: $p21^{Waf1/Cip1}$, $p27^{Kip1}$ i $p57^{Kip2}$ ¹⁷⁶. A diferència dels inhibidors de la família *Ink4*, els de la família *p21* s'uneixen amb més afinitat amb els complexos ciclina-cdk que amb la quinasa sola. Els membres de la família de *p21* presenten un domini N-terminal comú que està involucrat en la interacció i inhibició d'aquests complexos ciclina-cdk i un domini C-terminal, només present a $p21^{Waf1/Cip1}$, que interacciona i inhibeix l'antigen nuclear de cèl·lules proliferants (PCNA). L'acció coordinada dels dos efectes duu a la inhibició del cicle quan $p21^{Waf1/Cip1}$ s'indueix. Entre aquests casos destaquen la inducció transcripcional de $p21^{Waf1/Cip1}$, mediada per *p53*, en resposta a l'alteració de l'ADN. En el cas de $p27^{Kip1}$, els seus nivells estan elevats en cèl·lules en repòs i disminueixen notablement en resposta a factors de creixement, aparentment per la seva proteòlisi dependent d'ubiquitina.

- $p21^{Waf1/Cip1}$:

Es la primera CKI que es va identificar, l'any 1993, quan es comprovà que la seva expressió podia ser induïda per *p53* nativa¹⁸⁰ i no per la *p53* mutada. Consta de 189 aminoàcids i la codifica un gen localitzat a 6p21.2.

$p21^{Waf1/Cip1}$ és un important mediador de l'aturada del creixement i de la senescència. Donada la seva important tasca en la regulació de l'aturada del cicle cel.lular per part de p53, és considerat com un gen supressor tumoral. No obstant, les mutacions de $p21^{Waf1/Cip1}$ són rares en humans ¹⁸¹, ja que s'ha evidenciat que ratolins "knock-out" per $p21^{Waf1/Cip1}$ es desenvolupen amb normalitat i no mostren un augment del nombre de tumors ¹⁸². L'aturada del cicle cel.lular com a conseqüència de l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ succeeix tant a la fase G_1 com G_2 ¹⁸³. Aquest fet s'acompanya pel desenvolupament de marcadors morfològics i fenotípics de senescència en algunes o la totalitat de les cèl.lules ¹⁸⁴. L'aturada del cicle mediada per $p21^{Waf1/Cip1}$ és resultat de la seva habilitat per inhibir els complexos ciclina-cdk. Això comporta la desfosforilació de pRb/p105 i la inhibició d'un gran nombre de gens dependents d'E2F, els quals es troben implicats en la replicació de l'ADN i la progressió del cicle cel.lular ¹⁸⁵. Aquest últim efecte s'atribueix al segrest d'E2F per la pRb/p105 desfosforilada, encara que $p21^{Waf1/Cip1}$ també sembla inhibir E2F a cèl.lules sense pRb/p105 ¹⁸⁶.

La inducció de $p21^{Waf1/Cip1}$, mediada tant per factors dependents de p53, com per factors independents de p53 (com, per exemple, la TGF- β ¹⁸⁷), s'ha associat tant amb formes transitòries com permanents d'aturada del cicle cel.lular. L'aturada transitòria evita que les cèl.lules danyades entrin en mitosi ¹⁸⁸. D'altra banda, en alguns casos la inducció transitòria de $p21^{Waf1/Cip1}$ també succeeix al començament de l'aturada permanent del creixement, tal com s'ha observat a fibroblastes normals ¹⁸⁹ i a cèl.lules tumorals després de patir dany genòmic o introduir l'oncogen ras ¹⁹⁰. $p21^{Waf1/Cip1}$ també s'indueix amb l'aturada final del creixement durant la senescència replicativa dels fibroblastes quan envelleixen ¹⁹¹.

L'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ a les cèl.lules quiescents es troba habitualment reduïda o absent. D'altra banda, s'ha postulat també un possible paper de $p21^{Waf1/Cip1}$ en la inducció de l'apoptosi encara que aquesta qüestió continua essent motiu de controvèrsia i els efectes de $p21^{Waf1/Cip1}$ podrien ser dependents del contexte.

Un fet interessant és que $p21^{Waf1/Cip1}$ (i d'altres CKIs semblants) poden activar els complexos ciclina-cdk¹⁷⁶. Aquest fet es basa en què la raó de les unions estequiomètriques de $p21^{Waf1/Cip1}$ amb els complexos ciclina-cdk pot ser més gran de 1:1. L'activitat del complex ciclina-cdk només és inhibida a raons altes d'unió de $p21^{Waf1/Cip1}$ a aquests complexos. Recentment s'ha postulat que l'aturada del creixement induïda per $p21^{Waf1/Cip1}$ s'associa amb l'exhauriment de les proteïnes controladores de la mitosi, i això pot contribuir a anomalies en el procés mitòtic (tetraploidia, poliploidia, aneuploidia)¹⁹² a les cèl.lules tumorals.

Per acabar, la inducció de $p21^{Waf1/Cip1}$ pot ocasionar la desestabilització genètica de les cèl.lules tumorals exposades a radioteràpia o quimioteràpia¹⁸³, la qual cosa comporta el sorgiment de variants tumorals més malignes o resistents al tractament. La utilització de diversos agents quimioteràpics a les cèl.lules tumorals induïx un fenotipus senescent. Aquest fenomen s'associa amb alteracions de la ploidia cel.lular¹⁸⁴. Per tant, la reentrada al cicle cel.lular després de la inducció de $p21^{Waf1/Cip1}$ pot comportar una més gran desestabilització genètica, la qual cosa pot contribuir a la progressió tumoral.

- $p27^{Kip1}$:

$p27^{Kip1}$ va ser identificat com a inhibidor en cèl.lules bloquejades pel factor de creixement en transformació β (TGF- β) i es troba regulat per citokines inhibidores del creixement i per inhibició de contacte. El gen que codifica per $p27^{Kip1}$ es troba localitzat al cromosoma 12q13. La proteïna $p27^{Kip1}$ té 198 aminoàcids i està constituïda per un domini N-terminal semblant al de $p21^{Waf1/Cip1}$ ¹⁹³. $p27^{Kip1}$ es troba intensament expressat en cèl.lules no proliferants i juga papers importants en la regulació tant de la quiescència com de la progressió a G_1 . $p27^{Kip1}$ augmenta durant la diferenciació en molts tipus cel.lulars tant en cultiu de teixits com "in vivo"¹⁹⁴. En ratolins "knock-out" per $p27^{Kip1}$ s'ha observat un excés de proliferació cel.lular que comporta organomegàlies, però no un augment de la incidència de tumors espontanis¹⁹⁵. Alguns estudis han evidenciat que la pèrdua o disminució de l'expressió de

$p27^{Kip1}$ és un marcador pronòstic de moltes neoplàsies malignes humanes, com mama, pròstata i bufeta ¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Un fet interessant és que mutacions específiques de tumor no han estat identificades pel gen de $p27^{Kip1}$. En lloc d'això, els baixos nivells de $p27^{Kip1}$ en alguns tumors s'han atribuït a un augment de la degradació, específica de tumor i mediada per proteasomes, de la proteïna ¹⁹⁹. Recentment s'ha identificat una nova isoforma de $p27^{Kip1}$ anomenada $p27^{Kip1R}$, per la seva resistència a la degradació. Es diferencia de $p27^{Kip1}$ en el seu extrem C-terminal i podria ser un inhibidor del cicle cel.lular, amb una tasca diferent a la desenvolupada per $p27^{Kip1}$ ²⁰⁰.

d.1.4) Punts de control del cicle cel.lular

a) G_1 -S:

En aquest punt es troba implicat de manera destacable $p53$, que té un paper essencial en l'aturada de les cèl.lules a G_1 després de dany genòmic. Actualment es coneixen els mecanismes potencials mitjançant els quals la pèrdua de funció de $p53$ en aquest punt de control pot comportar un augment de la susceptibilitat al càncer. En primer lloc, es sap que el dany a l'ADN augmenta els nivells de $p53$ i la seva activitat, la qual cosa fa que s'incrementin secundàriament els nivells de $p21^{Waf1/Cip1}$. L'elevació dels nivells de $p21^{Waf1/Cip1}$ inhibeix l'activitat dels complexos ciclina-cdk que dirigeixen la transició G_1 a S a l'impedir la hiperfosforilació de $pRb/p105$. En cèl.lules on falta $p21^{Waf1/Cip1}$, l'aturada de G_1 a S després de dany a l'ADN és defectuosa ¹⁸². Tal com es comenta més endavant, a més de tenir un paper decisiu en l'aturada de G_1 a S, $p53$ també pot dirigir les cèl.lules cap a una via apoptòtica, quan les lesions de l'ADN no poden ser reparades ²⁰¹. Els mecanismes que indueixen $p53$ a aturar el cicle cel.lular o induir l'apoptosi no es coneixen prou bé. Tanmateix, no hi ha cap dubte que la pèrdua de $p53$ produeix una resposta cel.lular inadequada, mitjançant dos mecanismes: (a) permet que l'ADN danyat es repliqui i (b) allarga la supervivència de cèl.lules que haurien de ser eliminades per apoptosi.

D'altra banda, s'han identificat dos nous gens relacionats amb p53, anomenats p73 i p63^{202, 203}. La importància d'aquests gens al càncer humà i als punts de control requereix d'estudis addicionals.

b) Fase S:

El punt de control a la fase S roman poc conegut en humans, encara que s'han identificat gens a llevats (MEC1, MEC2 i HUS1) amb aquesta funció²⁰⁴. El gen ATM podria ser l'equivalent en l'home de MEC1. Es troba mutat a l'atàxia-telangiectàsi, una entitat on tots els punts de control del dany genòmic (G₁-S, S, G₂-M) es troben alterats²⁰⁵.

c) G₂-M:

Actualment es sap que si l'ADN no ha estat correctament replicat, la cèl.lula no continua el cicle i resta aturada a la fase G₂ fins que aquests errors són corregits per mecanismes de reparació. L'aturada de les cèl.lules a la fase G₂ després de dany a l'ADN ocasiona inestabilitat genètica i un augment de la radiosensibilitat. L'entrada a la mitosi és dirigida per l'acció del complex ciclina B-cdk1, que s'acumula en estat fosforilat (inactiu) al llarg de les fases S i G₂. La desfosforilació (activació) d'aquest complex (particularment a la Tyr15 i la Thr14) és induïda per la fosfatasa Cdc25c, la qual pot ser inactivada per les proteïnes 14-3-3 σ ²⁰⁶. Segons un estudi recent²⁰⁷, en aquest punt de control també hi estarien implicats p53, p21^{Waf1/Cip1} i, fins i tot, ATM.

d) punt de control del fus mitòtic:

Aquest punt impedeix la transició de metafase a anafase fins que tots els parells de cromàtides "germanes" no s'han alineat i s'han enganxat al fus mitòtic. Alteracions en aquest punt de control poden induir canvis en el nombre de cromosomes, amb l'aparició de tetraploidia i aneuploidia. Tanmateix, no s'han identificat en l'home els gens que aturen la mitosi quan es produeixen alteracions als microtúbuls²⁰⁸.

En canvi, una troballa interessant ha estat la implicació de p53 en aquest punt de control a ratolins²⁰⁹, la qual cosa, un cop més, demostra la seva importància en el cicle cel.lular. Fins i tot, p21^{Waf1/Cip1} podria estar també implicada en aquest punt, a l'haver relacionat p21^{Waf1/Cip1} amb alteracions de la ploidia cel.lular¹⁸⁴.

e) senescència cel.lular:

S'ha suggerit que la senescència cel.lular podria representar un tipus de punt de control, que s'activaria quan els telòmers s'escurcen fins a arribar a un nivell crític²¹⁰. Es creu que telòmers amb una llargària suficientment disminuïda poden ocasionar anormalitats a la cadena de l'ADN que activin senyals per aturar el cicle cel.lular i impedir la proliferació, donant lloc a senescència cel.lular.

Aquest fet podria ser important a la tumorigènesi, donat que les cèl.lules tumorals poden presentar alteracions als punts de control del cicle cel.lular. Per tant, si a més s'afegeix la producció de telomerasa, tot això contribueix al desenvolupament de cèl.lules tumorals immortals.

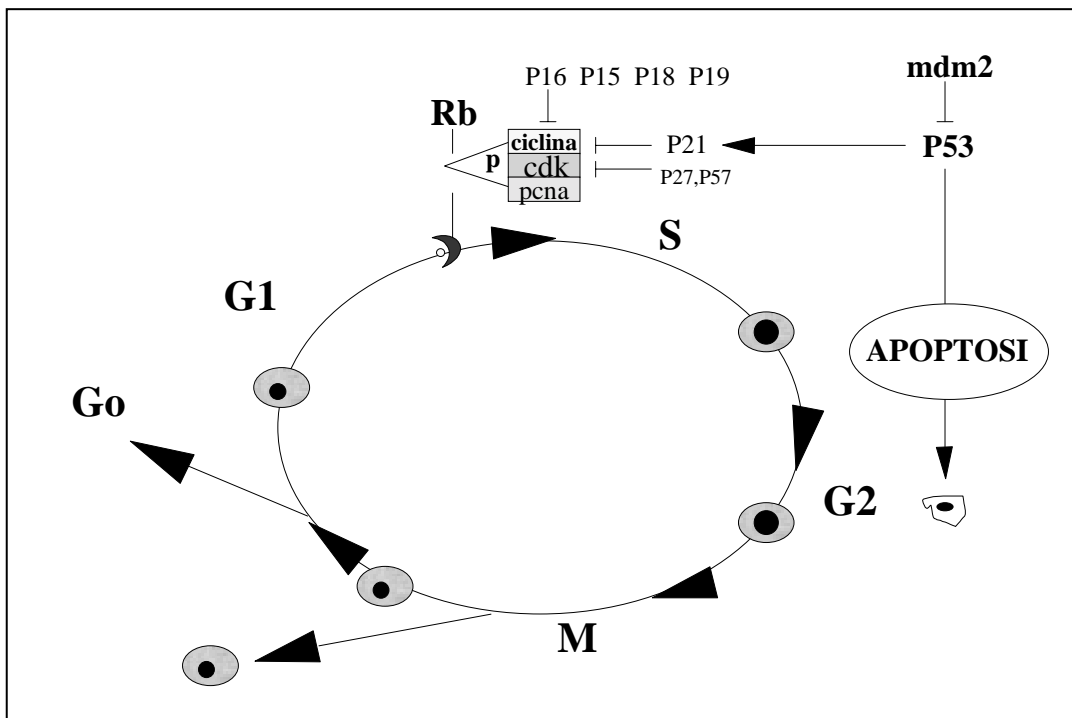


Fig.3. Característiques més importants de la regulació del cicle cel.lular

D.2. APOPTOSI

*La supervivència de les cèl.lules depèn de la contínua disponibilitat de factors tròfics, els quals sovint es troben en quantitats limitades i restringides en uns determinats ambients. Per tant, la desregulació de l'expansió cel.lular ocasiona un esgotament d'aquests factors locals de supervivència i l'entrada d'aquestes cèl.lules en un programa d'autodestrucció anomenat **apoptosi**. Així, podem definir l'apoptosi (o mort cel.lular programada) com una forma de mort cel.lular que elimina cèl.lules de l'hoste no desitjades mitjançant l'activació d'una sèrie de successos coordinats i programats internament que efectuen els productes d'una sèrie de gens. Per tant, representa un mecanisme alternatiu al control de la proliferació cel.lular per regular la població cel.lular, tant en teixits normals com neoplàsics.*

La primera observació de cèl.lules mortes correspon a l'any 1665, quan Hooke ideà el terme "cèl.lula" amb la finalitat de descriure unes estructures que havia observat en estudiar microscòpicament el suro ²¹¹. La mort cel.lular fou descrita l'any 1842, quan es va observar el procés de mort neuronal a embrions de gripau ²¹². El terme "mort cel.lular programada" data de l'any 1965, per descriure la mort cel.lular en la metamorfosi d'insectes ²¹³. L'any 1966 es va demostrar que la pèrdua de la cua dels capgrossos estava relacionada amb la mort cel.lular i que podia ser bloquejada amb cicloheximida, amb la qual cosa es va deduir que requeria de l'expressió de gens endògens ²¹⁴. Tanmateix, el terme "apoptosi" no aparegué fins a l'any 1972 ²¹⁵, quan s'evidencià que la morfologia d'hepatòcits exposats a toxines i limfòcits tractats amb hormones era molt semblant a l'observada a experiments embriològics descrits amb anterioritat ²¹⁶. Aquest descobriment va adquirir importància quan l'any 1988 es descobrí l'activitat antiapoptòtica de bcl-2 ²¹⁷, fet que va obrir tot el camp de la investigació de l'apoptosi al càncer en un nivell molecular, amb importants avenços especialment en els darrers anys.

S'ha comprovat que l'apoptosi succeeix a les següents circumstàncies: (a) durant el desenvolupament, (b) com un mecanisme homeostàtic per mantenir les poblacions cel·lulars als teixits, (c) com un mecanisme de defensa, com per exemple les reaccions immunes, (d) quan les cèl·lules estan lesionades per malalties o agents nocius i (e) a l'envelliment.

L'apoptosi és considerada com la forma "normal" que tenen les cèl·lules de morir-se, a diferència de la necrosi, que és una forma "traumàtica" de mort cel·lular, provocada per l'acció intensa d'estímuls externs a la cèl·lula. Nogensmenys, ambdós tipus de mort cel·lular poden coexistir en un gran nombre de situacions.

El procés apoptòtic pot començar per diferents estímuls: (a) retirada de factors de creixement, (b) dany a l'ADN, (c) alteracions a la regulació del cicle cel·lular i (d) unió a receptors letals. Quan aquest procés s'altera, contribueix en un gran nombre de malalties com el càncer, malalties autoimmunes i malalties neurodegeneratives²¹⁸.

d.2.1) Característiques morfològiques de les cèl·lules apoptòtiques

D'entre les característiques morfològiques de les cèl·lules apoptòtiques destaca la disminució del volum nuclear degut a la condensació del citoplasma, formant vesícules que protueixen ("blebs") i s'acaben desprenent de la cèl·lula. A més, al nucli també s'observa una condensació de la cromatina. Una altra característica és la fragmentació de l'ADN per unes endonucleases que actuen a nivell internucleosomal, formant fragments de 180 bp. Aquest procés de proteòlisi és selectiu per algunes proteïnes molt concretes. Finalment, les cèl·lules són fagocitades pels macròfags. El senyal que indueix la fagocitosis seria l'exposició de fosfatidil-serina, que habitualment es troba a la part interna de la membrana cel·lular, a la superfície externa. En cultius cel·lulars, on no hi han macròfags, les cèl·lules es destrueixen mitjançant una necrosi secundària²¹⁹.

d.2.2) Regulació del procés apoptòtic

L'esdeveniment clau a l'apoptosi és l'activació d'una sèrie de proteases anomenades caspases. Presenten una cisteïna al seu centre actiu i tenen especificitat pels residus d'àcid aspàrtic. Són sintetitzades com a proenzims i activades per la proteòlisi d'alguns residus d'àcid aspàrtic de la seva estructura. En la seva forma activa constitueixen tetràmers. Actualment ja s'ha demostrat que actuen sobre > 100 substrats ²²⁰, com per exemple les lamines, que mantenen l'estructura del nucli (amb la qual cosa quan les caspases actuen sobre elles es trenca l'estructura nuclear), i també sobre l'ICAD (un inhibidor d'ADNasa activat per caspases), amb la qual cosa s'allibera l'ADNasa que permet tallar l'ADN pels espais internucleosomals.

Les caspases es subdivideixen en caspases pro-inflamatòries (ex: caspasa 11) i caspases pro-apoptòtiques. Aquestes darreres habitualment es troben en forma inactiva i, segons la seva funció, es poden dividir en: **iniciadores**, les quals activen altres caspases mitjançant dues vies: la via dels receptors letals (ex: caspasa 8) i la via mitocondrial (ex: caspasa 9), i **efectores**, activades per les iniciadores i són les que realment actuen sobre els substrats (ex: caspasa 3).

La **via dels receptors letals** és desencadenada per membres de la superfamília dels receptors letals (com CD95 i TNFR-1) ²¹⁸, que actuen sobre la caspasa 8. En canvi, la **via mitocondrial** és utilitzada extensament en resposta a senyals extracel·lulars i lesions internes, com el dany de l'ADN. Aquestes múltiples vies de resposta convergeixen a la mitocòndria, sovint mitjançant l'activació d'un membre pro-apoptòtic de la família BCL-2 ²¹⁸, amb la finalitat d'activar la caspasa-9 tal com s'explica més endavant. La **convergència** de la via dels receptors letals i la via mitocondrial activa la caspasa-3. Aquest fet condueix en fases posteriors a la generació d'una munió de subprogrames de mort cel·lular, la suma dels quals ocasiona l'eliminació de la cèl·lula.

La **família BCL-2** rep aquest nom del membre fundacional Bcl-2 ("B-cell lymphoma-2"), que codifica una proteïna de 26 kDa i va ser descrita l'any

1984 ²²¹ per la seva associació amb la translocació cromosòmica t(14;18)(q32;q21), característica però no exclusiva del limfoma fol·licular. Actualment s'han identificat més d'una dotzena de components, els quals es poden classificar en 3 grups funcionals ²²². Els membres del primer grup, com Bcl-2 i Bcl-xL es caracteritzen per tenir 4 dominis curts a la seva estructura (BH1-BH4) i per una cua hidrofòbica C-terminal (TM), que permet la localització d'aquestes proteïnes a la superfície externa de les mitocòndries, tot i que també les podem trobar al reticle endoplasmàtic i a la membrana nuclear. La seva característica principal és la seva activitat antiapoptòtica. Bcl-2 forma homodímers amb proteïnes homòlogues per tal d'assolir la seva capacitat funcional i també s'associa amb altres proteïnes no homòlogues, com raf-1 ²²³. S'ha proposat que Bcl-2 podria actuar modificant la permeabilitat d'un porus situat a la membrana mitocondrial, el qual condueix la producció d'ATP ²²⁴. El segon grup, que inclou membres com Bax i Bak, es diferencia del primer en que no presenten el domini BH4 i la seva activitat és pro-apoptòtica. Finalment, el tercer grup conté una col·lecció de proteïnes diverses, com Bid i Bik, que comparteixen la presència del domini BH3 en tots els casos. Malauradament, encara no es coneixen els múltiples i complexos mecanismes d'acció dels membres de la família BCL-2.

A diferència de la proteïna Bcl-2, que sembla realitzar la major part de la seva activitat funcional a les membranes intracel·lulars, molts membres del segon i tercer grup, com Bax, Bad, Bim i Bid, poden anar del citosol als orgànuls i vice-versa ²¹⁸. La forma citosòlica és inactiva, però preparada per actuar immediatament. Així, senyals pro-apoptòtics, activats per proteòlisi, fosforilació i, probablement, per molts d'altres mecanismes, fan que aquestes proteïnes es dirigeixin cap a la mitocòndria ²²⁵. Llavors els membres pro-apoptòtics i antiapoptòtics es troben a la superfície de la mitocòndria, on competeixen per regular la sortida del citocrom c. Si acaben dominant les proteïnes pro-apoptòtiques es produeix l'alliberament de diverses molècules des del compartiment mitocondrial al citosòlic. La principal, com ja s'ha comentat, és el citocrom c. Aquesta sortida de citocrom c és el fet més destacable d'aquesta via i el mecanisme pel qual es produeix roman obscuro. Un cop alliberada, s'uneix a una molècula adaptadora anomenada Apaf-1 i,

posteriorment, a la caspasa-9 (i possiblement a altres proteïnes) formant un apoptosoma. D'altra banda, les proteïnes anomenades de xoc tèrmic (en anglès, "heat-shock") actuen en múltiples etapes d'aquesta via per modular l'apoptosi ²¹⁸. Recentment, s'ha identificat una molècula que s'uneix a la proteïna Bcl-2 i indueix apoptosi a cèl.lules tumorals ²²⁶. Això podria obrir les portes a noves alternatives terapèutiques.

Tot seguit, la figura 4 resumeix els esdeveniments més importants que succeeixen durant l'apoptosi.

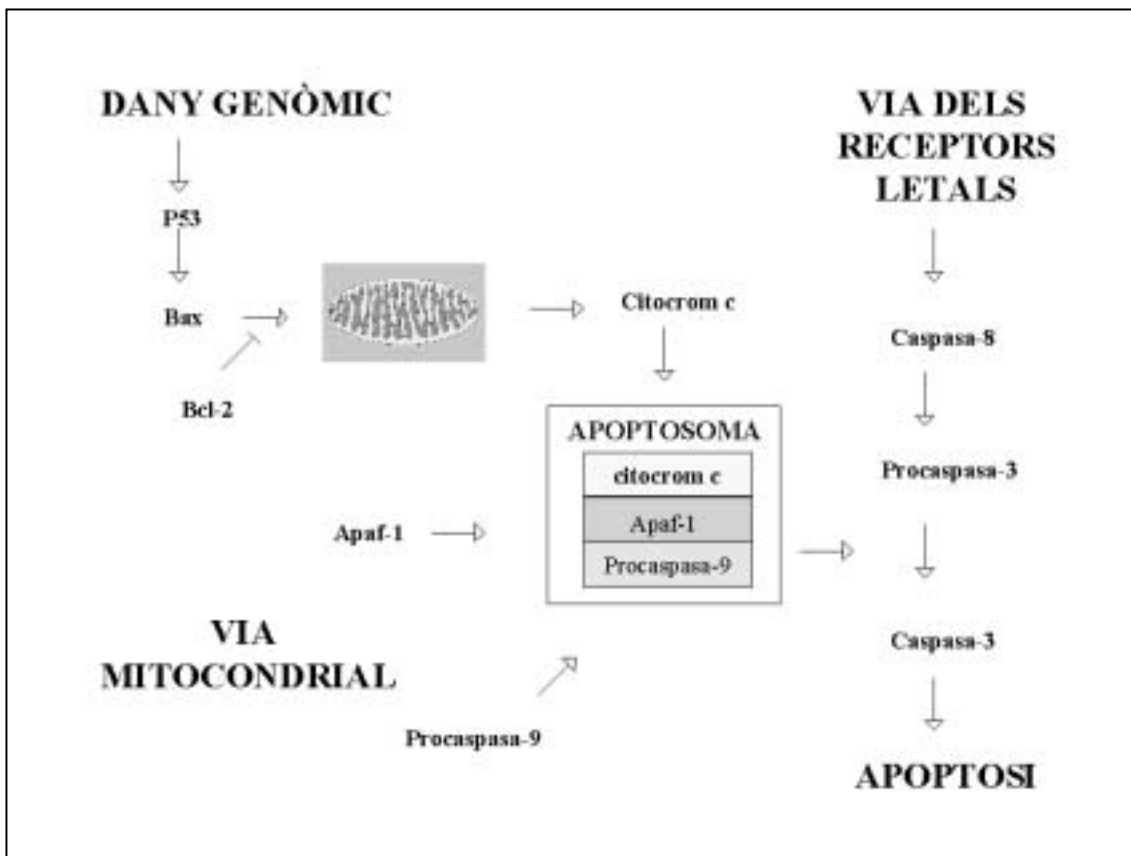


Fig. 4. Esdeveniments més importants durant l'apoptosi.

d.2.3) p53

L'apoptosi és la resposta cel.lular típica enfront de moltes formes d'estrès cel.lular, i particularment del dany a l'ADN. Entre els diversos senyals

activadors de l'apoptosi s'inclouen un gran nombre dels trobats a cèl.lules neoplàsiques incipients, com la hipòxia i privació de nutrients, així com dany genòmic secundari a l'erosió dels telòmers, defectes a la reparació, desregulació d'oncògens i diverses teràpies. La proteïna p53 és important en la integració d'aquests senyals i el seu funcionament és similar a la d'un node integrat a una xarxa de tipus World Wide Web (WWW) ²²⁷, permetent la transducció d'aquests senyals i així produir respostes d'apoptosi i aturada del creixement de les cèl.lules tumorals. Tot això implica que ha d'existir una propensió per part de les cèl.lules tumorals a perdre la funció normal de p53. A més, diferents estímuls que activen p53 succeeixen a les diverses etapes de la progressió tumoral.

a) Característiques moleculars de p53:

El gen supressor tumoral TP53 va ser descobert l'any 1979 ²²⁸, encara que inicialment es va considerar que era un oncogen. L'any 1991 es va demostrar que p53, a més d'aturar el cicle cel.lular, induïa l'apoptosi ²²⁹. Es troba localitzat a 17q13.1 i codifica una fosfoproteïna tetramèrica nuclear de 53-kDa anomenada p53, de 393 aminoàcids ²³⁰. Entre els aminoàcids 102 a 292 conté un domini nuclear específic d'unió a l'ADN, amb una funció reguladora en la transcripció. En les regions conservades d'aquest domini central (en anglès, "core domain") és on es donen la major part de mutacions a TP53 identificades a tumors primaris humans, havent-se documentat ja 15.121 mutacions somàtiques i 196 mutacions de la línia germinal (<http://www.iarc.fr/p53/index.html>, comprovada el 25 de Juliol de 2001).

b) Funcionament normal i degradació de p53:

Com ja s'ha comentat, p53 s'activa en situacions d'estrés o dany genòmic, situació en la qual són més probables les mutacions i la pèrdua del control del cicle cel.lular, fets que augmenten marcadament el risc d'esdevenir cèl.lules canceroses. La proteïna p53 nativa s'uneix a diversos punts d'unió en forma de tetràmer i estimula l'expressió de gens que inhibeixen el creixement i/o la invasió. Aquesta expressió es pot perdre de diverses maneres. Així, en

alguns tumors, la pèrdua d'un o ambdós al·lels disminueix la concentració dels tetràmers de p53 per sota dels requeriments necessaris per tal d'estimular l'expressió gènica. En altres tumors, una mutació sense sentit ("non-sense") dóna lloc al truncament de p53 i la pèrdua del domini d'oligomerització a la localització C-terminal evita que la p53 mutada participi a la composició dels tetràmers. Més freqüentment, un al·lel de p53 desenvolupa una mutació de sentit equivocat ("missense"). Això fa que disminueixin els tetràmers composts només per monòmers p53 nadius. Aquests tetràmers de tipus natiu-mutant no funcionen amb normalitat i l'efecte dominant negatiu pot ser exacerbat per l'augment de l'estabilitat de la proteïna mutada respecte a la nativa. Això fa que augmenti la concentració intracel·lular de p53 i sigui més probable la seva detecció mitjançant tècniques immunohistoquímiques. De tota manera, una mutació de sentit equivocat d'un al·lel de p53 s'associa freqüentment amb la deleció de l'altre al·lel, generalment per recombinació mitòtica, donant lloc a l'absència de tetràmers de p53 nadius²³¹.

En cèl·lules sense dany genòmic i que es divideixen mitjançant un cicle cel·lular normal, p53 és altament inestable, amb una vida mitjana de minuts. En canvi, quan es produeix el dany a l'ADN, p53 inhibeix la progressió a través del cicle cel·lular i, fins i tot, en molts casos inhibeixen l'apoptosi d'aquestes cèl·lules en un intent desesperat de controlar el dany i protegir l'organisme. Actualment es creu que aquesta activació de p53 no estaria controlada per un únic lloc de fosforilació, sino per un conjunt de llocs de p53 l'estimulació dels quals dependria del tipus de senyal desencadenant de l'activació de p53 i, fins i tot, per altres mecanismes encara no prou ben coneguts²²⁷.

La degradació de p53 es produeix per la unió de moltes còpies a l'extrem C-terminal de p53 d'un petit pèptid anomenat ubiquitina. Aquest pèptid actua com una "diana" que permet la destrucció de p53 per part d'enzims proteolítics. La degradació de p53 és regulada per la proteïna mdm2 mitjançant un mecanisme de retroalimentació negativa. Habitualment, p53 s'uneix a la regió reguladora del gen mdm2 i estimula la transcripció a ARNm i,

posteriorment, la traducció a proteïna. Llavors, mdm2 s'uneix a p53 i estimula la seva ubiquitinació i posterior degradació ²²⁷.

Per tant, p53 representa un fre essencial al desenvolupament tumoral. Això explicaria que mutacions puntuals a TP53 que duen a terme la sobreexpressió de proteïna p53 mutada (inactiva) siguin les alteracions genètiques més freqüents descrites (en més del 50% dels casos) en càncers sòlids humans ²³². En aquestos casos amb p53 mutada, podem suposar que l'apoptosi estarà inhibida. Donat que els agents quimioteràpics indueixen apoptosi en part per mecanismes dependents de p53, les cèl.lules amb p53 mutada no solament s'acumulen més ràpidament durant la progressió tumoral, sino que són més resistents quan es comença la teràpia. Per aquest motiu, mutacions de TP53 s'han associat tant a la progressió tumoral com a l'adquisició de resistència i a les recidives després de la teràpia ²³³.

c) Mecanismes d'activació de p53:

p53 es pot activar per 3 vies independents ²²⁷:

- per dany genòmic: com el causat per radiacions ionitzants. L'activació d'aquesta via depèn de dues proteïna-quinases anomenades ATM i Chk2.
- per senyals de creixement aberrants: com les resultants de l'expressió dels oncogens ras i c-myc. L'activació d'aquesta via depèn de p14^{ARF}, que inhibeix mdm2.
- per mecanismes no dependents d'ATM, Chk2 ni p14^{ARF}: utilitzades per agents quimioteràpics, llum ultraviolada i inhibidors de proteïna-quinases. En la seva actuació hi poden estar implicades proteïnes com ATR i la caseïn-quinasa II.

Aquestes 3 vies inhibeixen la degradació de p53, estabilitzant-la i, com ja s'ha comentat amb anterioritat, augmentant la seva concentració, la qual cosa permet la seva detecció per tècniques immunohistoquímiques utilitzant marcadors adequats que detectin les formes nativa i mutada de p53.

d) Conseqüències de l'activació de p53:

La p53 activada s'uneix a seqüències específiques d'ADN, en una unitat estimuladora de localització distal, des d'on estimula TRAP80, un cofactor de l'ARN-polimerasa II, afavorint el procés de transcripció ²³⁴. Pràcticament totes les mutacions de TP53 disminueixen la capacitat de la proteïna p53 d'activar la transcripció.

S'han identificat un gran nombre de gens controlats per p53 i que intervenen en els següents processos:

- inhibició del cicle cel.lular: mitjançant l'estimulació directa de p21^{Waf1/Cip1}, que inhibeix les fases de transició G₁-S i G₂-M. També estimula l'expressió de la proteïna 14-3-3σ, que segresta els complexos ciclina B₁-cdk1 i manté el bloqueig a G₂. Un altre gen, anomenat Reprimo, també atura les cèl.lules a G₂. p53 també actua sobre GADD ²²⁷.

- apoptosi: estimula la via mitocondrial de l'apoptosi activant directament la transcripció del gen bax, NOXA i P53AIP1. p53 també actua a la via dels receptors letals sobre proteïnes, com per exemple PIDD, que tenen similituds amb els receptors letals clàssics TNF i Fas. Finalment, p53 també pot actuar estimulament directament la mitocondria per tal de produir un excés de productes oxidants altament tòxics.

- estabilitat genètica: p53 pot afavorir l'estabilitat i la reparació dels gens, encara que els mecanismes no són encara prou coneguts. Sembla que podria estimular els gens que regulen la reparació de l'ADN per escissió de nucleòtids, la recombinació i la segregació dels cromosomes. S'ha observat que p53 indueix una ribonucleòtid reductasa específica després de dany genòmic ²²⁷.

- inhibició de la formació de vasos sanguinis: p53 estimula l'expressió de gens que inhibeixen l'angiogènesi.

Malgrat l'abundant informació disponible sobre p53, no és encara una molècula prou coneguda. Actualment, p53 està essent investigat per utilitzar-la com a teràpia gènica. Recentment, s'ha descobert un virus anomenat Onyx-015 que actua sobre cèl.lules p53 mutades afavorint la seva destrucció.

Estudis preliminars en carcinomes de cap i coll intractables han donat resultats esperançadors, la qual cosa pot fer pensar en una possible alternativa als tractaments existents per les formes agressives del càncer²³⁵.

D.3. MECANISMES D'INVASIÓ TUMORAL I METÀSTASI

Les neoplàsies humanes són heterogènies en moltes de les seves propietats, entre les quals s'hi troben la capacitat d'invasió i metastasi. El procés metastàtic és seqüencial i el creixement de les metastasis constitueix la culminació d'una sèrie d'esdeveniments letals que només un reduït nombre de cèl.lules tumorals aconsegueix superar. La formació de les metastasis depèn de la interacció de les cèl.lules metastàsiques amb diferents factors homeostàtics de l'hoste. Així, les cèl.lules metastàsiques que sobreviuen, ho fan mitjançant la usurpació dels mecanismes homeostàtics de l'hoste²³⁶.

d.3.1) Nutrició i angiogènesi

Un cop la cèl.lula esdevé neoplàsica, la proliferació progressiva d'aquestes cèl.lules es veu afavorida inicialment pels nutrients (factors de creixement) que aporta el microentorn de l'òrgan per difusió i per l'absència de molècules tòxiques. Una massa tumoral de menys de 0,5 mm de diàmetre pot rebre oxigen i nutrients per difusió. Quan la mida de la tumoració va més enllà de 0,5 mm, requereix de la proliferació i morfogènesi de cèl.lules endotelials vasculares²³⁷.

L'angiogènesi consisteix en una sèrie de processos seqüencials que s'inicien a les cèl.lules endotelials microvasculars. Per a què es formin brots capilars, les cèl.lules endotelials han de proliferar, migrar i penetrar en l'estroma de l'hoste, dirigint-se la migració cap a la font de molècules angiogèniques que són alliberades tant per les cèl.lules tumorals com per les cèl.lules de l'hoste, entre les quals hi han cèl.lules endotelials, epitelials, mesotelials i leucòcits.

d.3.2) Invasió tissular i metàstasi a distància

Un cop assegurat el subministrament de nutrients, comencen a adquirir importància un conjunt de mecanismes, que no són mutuament excloents, i afavoreixen el potencial invasiu d'aquestes cèl.lules²³⁸:

a) infiltració per pressió mecànica:

La ràpida multiplicació de les cèl.lules tumorals deriva en un augment de la mida tumoral i la capacitat d'infiltració per pressió mecànica.

b) disminució de la cohesió:

La pressió mecànica no justifica la freqüent observació histològica de cèl.lules tumorals aïllades o formant agregats en el teixit de l'hoste, sense establir continuïtat amb la massa tumoral adjacent. La major part de les cèl.lules tumorals poseeixen la maquinària citoplasmàtica necessària per a la seva mobilitat activa. Aquesta mobilitat s'associa a una alteració dels elements citoesquelètics i de les respostes al factor d'automobilitat de citoquines, al factor de dispersió, a la tromboplastina, a la matriu extracel.lular i a monoquines derivades de monòcits.

L'augment de la mobilitat de les cèl.lules tumorals és precedida per una disminució de les forces cohesives entre les cèl.lules. Des de fa anys es coneix l'existència de molècules de membrana que modulen l'adhesió de les cèl.lules al seu entorn, tant les cèl.lules normals les tumorals. Tradicionalment s'han dividit en molècules d'adhesió intercel.lular (cadherines, selectines, integrines) i molècules d'adhesió a la matriu extracel.lular (integrines²³⁹, receptors de laminina, galectines (particularment la galectina-1 i la galectina-3^{240, 241}, CD44²⁴² i CEA).

c) destrucció de teixits de l'hoste per enzims degradants:

La matriu extracel.lular (MEC) i formes particulars d'ella, com les membranes basals, han de ser permeables per a que les cèl.lules malignes abandonin el compartiment neoplàsic i viatgin per l'estroma intercel.lular fins als vasos limfàtics i sanguinis. De tot l'anterior es dedueix que aquests elements invasius han de contar amb uns mecanismes que permetin l'ancoratge, la degradació i la progressió per la MEC.

Les membranes basals i la MEC del teixit connectiu estan formades per quatre tipus de molècules: colàgens, elastina, glucoproteïnes i proteoglicans. La proporció de cadascuna d'elles és diferent segons el tipus de teixit i la membrana basal. Aquests components de la MEC s'estabilitzen i s'organitzen gràcies a una sèrie d'interaccions entre proteïnes, així com entre proteïnes i polisacàrids. Aquestes interaccions es desestabilitzen per acció d'enzims catalítics, anomenats genèricament proteases.

S'han identificat 3 classes de proteases: metal.loproteases de la matriu (MMPs), serin proteases i cistein proteases. D'entre les cistein proteases, en destaquen unes de tipus papaïna anomenades **catepsines**, de localització lisosomal, de les quals se n'han descrit 11 fins a l'actualitat ²⁴³. S'ha proposat que, entre altres funcions, estarien implicades en la progressió tumoral degut a les seves propietats degradants de la MEC, a angiogènesi o a l'activació d'altres proteases latents ²⁴⁴. La catepsina B (Cat B) es va purificar l'any 1973 ²⁴⁵ i és una proteïna de 339 aminoàcids que és codificada per un gen situat a 8p22 ²⁴⁶. Es troba implicada en el recanvi normal de proteïnes en les cèl.lules de mamífers i s'expressa en un gran nombre de neoplàsies com el melanoma; carcinomes com els de mama, gàstric, pulmó, esòfag i bufeta ²⁴⁷⁻²⁵⁰ i sarcomes, com el condrosarcoma ²⁵¹. L'expressió de la Cat B al colon s'ha associat amb un estadi avançat de la malaltia i amb una curta supervivència ²⁵², havent-se observat resultats similars en tumors de cap i coll ²⁵³. La catepsina S (Cat S) es va purificar l'any 1975 ²⁵⁴, tot i que no es va clonar fins l'any 1992 ²⁵⁵. És una proteasa de 331 aminoàcids que és codificada per un gen localitzat a 1q21 ²⁵⁶. S'expressa en macròfags i altres cèl.lules presentadores d'antígens

²⁵⁷, però té també una potent activitat elastolítica i és capaç de degradar moltes molècules de MEC en un pH neutre ²⁴³.

d) metàstasis

A continuació, les cèl·lules tumorals poden envair el sistema limfàtic o accedir als vasos sanguinis, des d'on tenen la possibilitat d'interaccionar amb els teixits de l'hoste. A l'etapa final del procés metastàtic, per produir lesions detectables clínicament, les metàstasis han de desenvolupar una xarxa vascular i evitar les respostes immunes de l'hoste. Les cèl·lules tumorals també poden envair l'estroma de l'hoste, penetrar als vasos sanguinis i accedir al torrent circulatori per produir metàstasis secundàries, és a dir "metàstasis de metàstasis".

E. BASES MOLECULARS DEL CÀNCER DE PRÒSTATA

Els esdeveniments moleculars associats amb la iniciació, promoció i progressió del CP romanen encara poc entesos. Durant la progressió des d'epiteli prostàtic benigne cap a PIN i càncer alguns gens es sobreexpressen, mentre que d'altres són inhibits. Existeixen dades actualment que indiquen que els gens sobreexpressats són majoria, encara que no es coneix prou bé la seva importància. S'ha evidenciat una important agrupació de canvis en l'expressió de molts gens entre l'epiteli benigne i la PIN, indicant que en aquest punt es troba el llindar de la carcinogènesi prostàtica. Posteriorment, un petit nombre de nous canvis s'introdueixen a la progressió de PIN cap a CP localitzat, CP metastàtic i CP refractari a hormones, i es magnifiquen els canvis preexistents durant aquesta cascada de progressió ⁶⁶.

E.1. TRASTORNS DE LA PROLIFERACIÓ I DIFERENCIACIÓ DURANT LES FASES MÉS INICIALS DE LA CARCINOGENÈSI PROSTÀTICA

Es considera com a inici del tumor el moment en el qual la cèl.lula pateix la primera alteració genètica en un dels gens importants per a la proliferació cel.lular (iniciació). Com ja s'ha comentat anteriorment, el compartiment proliferatiu es localitza fonamentalment a la capa de cèl.lules basals, mentre que les cèl.lules luminals han anat perdent la seva capacitat proliferativa al diferenciar-se. A la PIN succeeix tot el contrari: en un procés que alguns autors han anomenat com a "infidelitat topogràfica", les cèl.lules basals van perdent aquesta funció proliferativa, mentre que les cèl.lules luminals la van incrementant ²⁵⁸. Aquests canvis premalignes a la proliferació estan associats a l'expressió aberrant d'oncògens (com erbB-2, erbB-3 i c-met) així com gens supressors tumorals (com nm23-H1) en les cèl.lules luminals, quan habitualment només s'expressen a les cèl.lules basals ⁶⁶. A més, alteracions importants als mecanismes de l'apoptosi donen com a resultat una expressió anormal de Bcl-2. Així, almenys el 20% de les PIN expressen l'oncoproteïna Bcl-2 al compartiment diferenciat de l'epiteli transformat ²⁵⁹. Aquest patró d'expressió anormal de Bcl-2 podria evitar que aquestes cèl.lules entressin en apoptosi. L'augment en la durada de la vida d'aquestes cèl.lules proliferatives, juntament amb el seu alt índex proliferatiu, genera un medi en el qual la inestabilitat genètica és més probable. Per tant, quan aquesta PIN progressi cap a CP es produiran una sèrie d'alteracions genètiques que més endavant es detallaran.

En la fase de promoció del tumor, les cèl.lules que contenen alguna alteració genètica i romanen fenotípicament normals, adquireixen característiques tumorals després d'haver estat exposades a un agent promotor, el qual no disposa de propietats mutagèniques i, consegüentment, aquestes cel.lules acaben progressant cap a la PIN. A la pròstata, a partir d'estímuls proliferatius periòdics, actuen com a agents promotors els andrògens (i potser també els estrògens, encara que en menor grau) després

d'haver-se lligat a receptors específics, amb la qual cosa indueixen la transcripció de gens que estimulen el creixement i la diferenciació de la pròstata. Aquest creixement continu permet la manifestació de les alteracions genètiques acumulades prèviament a la cèl.lula i, a més, augmenta la probabilitat de produir nous errors en la fidelitat de la replicació o reparació de l'ADN.

Donat el seu fenotip luminal, les cèl.lules de la PIN expressen receptors androgènics (RA) i PSA. Diversos estudis clínics han mostrat que la major part de lesions de PIN mostren característiques regressives com a conseqüència de privació hormonal, encara que lesions residuals de PIN poden continuar persistint durant llargs períodes de temps malgrat la situació de privació androgènica ²⁶⁰. S'ha observat també que l'expressió anormal de Bcl-2 tendeix a inhibir el RA, la qual cosa es demostra amb la reducció marcada dels nivells de receptors detectables ²⁵⁹. Per tant, es probable que les cèl.lules de PIN que sobreexpressen Bcl-2 siguin resistents a processos d'apoptosi mediat per andrògens.

D'altra banda, el paper dels estrògens en la transformació maligna de l'epiteli prostàtic continua essent motiu de controvèrsia, tot i que estudis epidemiològics i experimentals suggereixen la implicació dels estrògens a la carcinogènesi prostàtica ²⁶¹. En condicions normals, l'expressió del gen ER α es troba restringida a les cèl.lules basals. A la PIN, aquesta expressió es trasllada cap a les cèl.lules luminals ²⁶². Almenys el 10% de les PIN expressen la proteïna ER α a l'epiteli displàsic. A més, en alguns malalts amb CP localment avançat, s'ha identificat una proteïna induïda per estrògens, anomenada PS2, al teixit prostàtic benigne i displàsic, però no al teixit prostàtic de pacients sense evidència de CP ²⁶³. Aquestes dades suggereixen que els estrògens poden afectar fases inicials en la carcinogènesi prostàtica mitjançant un procés mediat per ER α ..

Altres canvis genètics destacables són (a) la hipermetilació del gen promotor de la GSTP-1, la qual cosa produeix una disminució de l'expressió de

gens que produeixen enzims destoxificadors de carcinògens, (b) l'expressió de telomerasa en un 25% de lesions de PIN i 85% de lesions de càncer de pròstata, amb la qual cosa no disminueix la longitud del final dels telòmers amb cada cicle cel.lular, afavorint la immortalitat cel.lular i (c) la sobreexpressió de múltiples còpies de c-myc⁶⁶.

Respecte a la hiperplàsia adenomatosa atípica (HAA), la seva naturalesa premaligna està molt menys establerta i, en aquest cas, l'expressió de bcl-2 es troba restringida a les cèl.lules basals. De tota manera, pot succeir que es produeixin desequilibris al·lèlics, fet que indicaria un lligam genètic entre l'HAA i el CP²⁸.

E.2. ALTERACIONS DELS MODULADORS DEL CICLE CEL.LULAR I APOPTOSI EN CARCINOMES DE PRÒSTATA

El paper dels oncògens cel.lulars no ha estat encara prou ben definit, durant la progressió del CP. Malgrat l'estudi de l'expressió dels gens ras, c-myc, n-myc i d'altres, no s'ha trobat cap marcador oncogènic que pugui augmentar la detecció del CP o pugui identificar els CP que podrien haver-se desenvolupat per una ruta citogenètica particular o tinguessin un comportament fenotípicament previsible⁶⁶.

Diverses mutacions en el gen Rb/p105 han estat associades amb un comportament agressiu i una evolució clínica pobre en determinats tumors. En el CP, aquestes mutacions del Rb/p105 han estat caracteritzades com a esdeveniments primaris a les fases més inicials de la progressió tumoral²⁶⁴. S'estima que el 20% dels CP presenten mutacions de Rb/p105 i aquest nombre podria incrementar-se donat la LOH al cromosoma 13q que afecta al locus de Rb/p105²⁶⁵. No obstant, és discutible si la inactivació del gen del Rb/p105 és un esdeveniment primari en la patogènesi del CP o secundari associat amb progressió de la malaltia²⁶⁶. L'activitat de pRb/p105 ha estat també associada a la inducció de l'apoptosi en diversos marcs cel.lulars²⁶⁷. En el cas de la pròstata, s'ha documentat un paper funcional de pRb/p105 al

comunicar l'apoptosi a cèl.lules del CP ²⁶⁸. Això ha promogut la idea que la inactivació de la via apoptòtica Rb/p105 podria ser un regulador crític de control que es perd durant la progressió metastàsica del CP.

La proteïna p53 es pot detectar immunohistoquímicament, segons diverses sèries, entre el 5 i el 97% de casos ^{269, 270}. En alguns casos, a més de sobreexpressió de p53 al CP, també se n'ha trobat a la PIN, suggerint que aquestes alteracions podrien ser un esdeveniment inicial a la tumorigènesi prostàtica ^{271, 272}. D'altra banda, els CP que recidiven localment després de prostatectomia radical o radioteràpia tenen una proporció de sobreexpressió de p53 més elevada que la dels tumors abans de ser tractats ^{273, 274}. La raó encara no es coneix.

p21^{Waf1/Cip1} s'expressa entre el 17 i 75% dels casos, segons diverses sèries publicades ^{275, 276}. En un estudi publicat amb CP primaris, sense mutacions de p53 demostrables, el 18% dels tumors presentaren mutacions per p21^{Waf1/Cip1} ²⁷⁷. A més, no s'ha trobat correlació entre la sobreexpressió de p53 i l'expressió de p21^{Waf1/Cip1} al CP, probablement degut a que la p53 mutada és incapaç d'activar p21^{Waf1/Cip1}. La pèrdua d'activitat de p21^{Waf1/Cip1} pot contribuir a la progressió del CP ja que s'ha demostrat una LOH que afecta 6p al CP ²⁷⁷. La correlació amb el grau de Gleason no queda clara, ja que en alguns casos no s'ha trobat correlació ²⁷⁸ i en d'altres la correlació ha estat inversa ²⁷⁹. S'ha observat recentment que, en cultius cel.lulars, el IFN- γ pot induir l'expressió de p21^{Waf1/Cip1} en la línia cel.lular DU-145 (del CP metastàsic) i inhibir la proliferació cel.lular ²⁸⁰.

En relació amb p27^{Kip1}, la pèrdua d'immunoreactivitat podria tenir un paper com a marcador pronòstic potent per predir un augment de la capacitat proliferativa i la progressió de la malaltia en malalts de CP ^{196, 281}.

E.3. ALTERACIONS EN LES LESIONS PROSTÀTIQUES PREMALIGNES QUE COMPORTEN L'ÍNICI DE LA INVASIÓ ESTROMAL

Les lesions prostàtiques premalignes es troben envoltades per membranes basals que expressen les mateixes proteïnes de membrana basal i receptors d'integrines que a l'epiteli normal i hiperplàsic²⁸². Durant el procés més inicial de la invasió estromal es produeixen canvis dramàtics que comporten la pèrdua de capacitat de diferenciació a cèl.lula basal de l'epiteli transformat. Així, la progressió de la PIN cap a les fases més inicials de CP invasiu es caracteritza per la pèrdua de proteïnes formadores d'hemidesmosomes i molècules d'adhesió associades, com el colagen VII, les subcadenaes $\beta 3$ i $\gamma 2$ de la laminina 5 i les integrines $\alpha 6/\beta 4$, que són essencials en àcins benignes i PIN per mantenir la diferenciació a cèl.lules basals²⁸³.

Un altre esdeveniment important a les etapes més inicials de la invasió estromal és la síntesi de membranes basals associades al tumor²⁸². Així, les cèl.lules del CP invasiu produeixen motllos semblants a membranes basals, per tal d'envair el teixit de l'hoste. També s'expressen altres tipus d'integrines, anomenades $\alpha 6\beta 1$ i $\alpha 2\beta 1$, que intervenen en l'ancoratge d'aquestes membranes basals neoplàsiques. Aquesta característica del tumor es manté durant els diversos estadis de la malaltia, incloses les fases metastàsiques i els canvis induïts pel tractament²⁸⁴. Finalment, aquestes membranes basals neoplàsiques es diferencien de les membranes basals normals en que són més susceptibles a l'acció de la pepsina, i també perquè no presenten laminina 5, colagen VII ni cadenaes $\alpha 5$ i $\alpha 6$ de colagen IV²⁸².

La capacitat d'extensió local i metàstasi del càncer de pròstata es troba regulat, entre d'altres factors, per l'activitat proteolítica de les cèl.lules tumorals, encara no prou ben estudiada. Actualment, hom sap que existeix una sobreexpressió de proteases al CP, particularment metal.loproteases (MMP). Així, l'expressió de colagenasa tipus IV (també anomenada, gelatinasa A o MMP-2) és mínima al teixit benigne i s'expressa de forma més destacable a la

PIN i carcinomes invasius de pròstata; si bé només es detecta, per hibridació "in situ", ARNm d'aquest enzim a l'estroma i no a l'epiteli tumoral ^{285, 286}. Recentment, s'ha observat que les MMP-2 i MMP-9 (gelatinasa B) s'associen amb un augment del patró combinat de Gleason, malgrat que l'associació més forta amb el CP avançat s'observà amb la raó de MMP-2 i MMP-9 amb la cadherina-E ^{287, 288}. Entre les estromalisines, la matrilisina s'expressa focalment en CP i a l'epiteli normal, tant en forma proteica com d'ARNm ²⁸⁶.

Estudis preliminars en sèries de CP han demostrat expressió de Cat B en cèl.lules prostàtiques benignes i neoplàsiques, on podrien estar implicades en la progressió tumoral i apoptosi ²⁸⁹⁻²⁹². D'altra banda, no existeix informació referent a l'expressió de Cat S al CP. En canvi, alguns estudis si que han relacionat el paper d'altres catepsines, com la catepsina D, en la progressió del CP ^{293, 294}.

Per acabar, no cal oblidar la importància de l'angiogènesi a la progressió tumoral. El paper de VEGF al carcinoma de pròstata ha estat força estudiat i sembla tenir un paper important en aquest sentit. Fins i tot, recentment s'ha reportat que l'angiogènesi tumoral i el VEGF estarien regulats per andrògens al CP sensible a andrògens ²⁹⁵.

E.4. MECANISMES D'INDEPENDÈNCIA HORMONAL

La causa principal de recaiguda després del tractament amb bloqueig androgènic és que el càncer de pròstata en cada pacient està format per una gran varietat de clons fenotípicament diferents prèviament al tractament. Així, en els tumors prostàtics s'han postulat tres tipus de fenotipus cel.lulars: androgen-dependents, androgen-sensibles i androgen-independents. Les cèl.lules tumorals androgen-dependents requereixen d'un nivell crític d'estimulació androgènica per a la seva supervivència i creixement; per tant, sense una adequada estimulació androgènica aquestes cèl.lules moren. Considerant tot això, aquestes cèl.lules són molt semblants a les cèl.lules no

neoplàsiques androgen-independents de la pròstata normal ²⁹⁶. D'altra banda, les cèl.lules androgen-sensibles no es moren, en absència d'andrògens, sinó que disminueixen la seva velocitat de creixement. El tercer grup cel.lular, les cèl.lules androgen-independents, no es moren ni disminueixen la seva velocitat de creixement, és a dir, són absolutament autònomes dels estímuls androgènics. Per tant, només les cèl.lules androgen-dependents són eliminades amb un tractament de bloqueig androgènic.

S'ha descrit un perfil de cèl.lules androgen-independents que inclouen (a) amplificacions al braç llarg del cromosoma 8q, on es troba expressat l'oncogen *c-myc*, (b) alteracions numèriques a Xp11-q13, on es localitza el receptor androgènic, (c) un increment de 7q, on es troba el receptor del factor de creixement epidèrmic i (d) alteracions a 5q, on es troba el gen supressor tumoral APC i la α -catenina. Tots aquests canvis podrien no tan sols afavorir l'adaptació a un ambient independent d'andrògens, sinó que també podrien ser essencials en la supervivència cel.lular.

La sobreexpressió de p53 també s'ha associat amb un fenotipus resistent als andrògens ²⁷⁸, havent-se trobat en 2/3 d'aquests tumors. També en els CP recurrents i independents dels andrògens s'ha observat que la sobreexpressió de p53 correlacionava amb l'amplificació del receptor androgènic ²⁷³. Aquest fet suggereix que la mutació de TP53, que pot conduir a inestabilitat genòmica, permet a un subgrup de CP adquirir propietats que afavoreixen el creixement tot i la presència de nivells baixos d'andrògens i, per tant, comporta progressió tumoral. Utilitzant tècniques d'hibridació genòmica comparada (HGC) s'han identificat anormalitats no només al cromosoma 17p, sinó també a 1p, 7, 8, 10q, 13q, 17q, 18q, 19, 22 i Xq als tumors independents dels andrògens ²⁹⁷. Aquesta heterogeneïtat genètica podria ser la raó fundamental del seu pronòstic desfavorable.

D'altra banda, l'oncogen *bcl-2* es troba altament expressat a les recaigudes. Sembla que el mecanisme es basaria en el bloqueig de la mort cel.lular, tasca que habitualment realitzen els andrògens, amb la qual cosa deixen de ser essencials i, per tant, es permetria la conversió a cèl.lules

independents dels andrògens ²⁹⁸. L'efecte net de la sobreexpressió de Bcl-2 seria el d'incrementar la velocitat de creixement de les cèl.lules tumorals. Una altra dada d'interès és que Bcl-2 no es detecta a la majoria de tumors dependents dels andrògens i, en canvi, s'expressa amb grans nivells en tumors independents dels andrògens ²⁹⁹. La privació crònica d'andrògens selecciona l'aparició de clons cel.lulars amb els receptors d'andrògens amplificats, els quals són més sensibles als nivells baixos d'andrògens ³⁰⁰. A més, s'han trobat mutacions puntuals específiques al domini del receptor d'andrògens que s'uneix a l'hormona i que canvia la seva resposta funcional respecte a les diferents hormones esteroidees ³⁰¹. Aquestes mutacions poden canviar la sensibilitat d'una cèl.lula als diferents factors de creixement polipeptídics ³⁰², i es creu que són responsables de la resposta paradoxal als antiandrògens, agents progestàgens i estrògens observada a la malaltia independent dels andrògens ³⁰³.

F. RESUM FINAL

Per acabar, donada la impossibilitat de resumir breument tots els marcadors implicats en la carcinogènesi prostàtica i potser en el seu pronòstic, a les pàgines següents es detalla un resum dels marcadors implicats en la carcinogènesi prostàtica segons la recent revisió efectuada per De Marzo et al ³⁰⁴, on ja es comenten les alteracions observades a la fase d'atròfia inflamatòria proliferativa (PIA). Referències bibliogràfiques específiques per a cada marcador es poden trobar a l'esmentada revisió.

MARCADORS SÈRICS	
Marcadors sèrics	PSA HK-2 Endotelina-1 PSAP VEGF (plasma) IGF-1 IGFBP-3 Licopè Isoflavonoids de la soja Seleni
Cèl.lules tumorals circulants	

Taula 8. Marcadors sèrics i carcinogènesi prostàtica.

HK = calicreïna humana, IGF = factor de creixement semblant a la insulina, IGFBP = proteïna que s'uneix a la IGF, PSA = antigen específic prostàtic, PSAP = fosfatasa àcida específica de la pròstata, VEGF = factor de creixement de l'endoteli vascular.

ALTERACIONS DE LA LÍNIA GERMINAL	
Gens familiars	HPC-1 Cromosoma X
Polimorfismes genètics modificadors del risc	Receptor de la vitamina D 3- β -hidroxiesteroid deshidrogenasa tipus II esteroid 5- α reductasa tipus II polimorfismes del receptor androgènic

Taula 9. Alteracions de la línia germinal proposades com a gens del càncer de pròstata hereditari o gens que suposen un factor de risc genètic*.

HPC = Càncer de pròstata hereditari.

* Les associacions genètiques que suposen un risc estan emergint en l'actualitat.

ALTERACIONS SOMÀTIQUES	
LOH	8p 6q 7q 9p i p16 10q 12p 13q 16q 17p 18q pTEN 2q, 5q, 6q, 15q, 11p, 1q, 3q i 2p
Guany / Amplificació cromosòmica	Guany 8q Guany 7 Guany Xq 11p, 1q, 3q, 2p Amplificació c-myc Amplificació RA PSCA Her-2/Neu Ciclina D1
Ploidia	
Metilació d'illes Cpg	GSTP-1 p16 ^{INK4a} Receptor b d'endotelina Receptor androgènic E-cadherina CD44

Taula 10. Selecció d'alteracions genòmiques somàtiques a la carcinogènesi prostàtica.

LOH = Pèrdua d'heterozigosi, PTEN = homòleg de fosfatasa i tensina (també anomenat MMAC1)

MARCADORS GENÈTICS I HISTOLÒGICS (*)						
		Normal	PIA	HGPIN	CaP	
Histopatologia	<i>Engrandiment nuclear</i>		-	-/+	+++	+++
	<i>Hipercromàsia nuclear</i>		-	-/+	+++	+++
	<i>Engrandiment nucleolar</i>		-	-/+	+++	+++
	<i>Agrupament cel.lular</i>		-	-/+	+++	+++
	<i>Pleomorfisme nuclear</i>		-	-/+	+++	+++
	<i>Hipercromàsia citoplasmàtica</i>		-	-/+	+ /+++	+ /+++
Alteracions en la textura de la cromatina i la morfometria nuclear		-		+++	+++	
MAC		+++ [#]				
Expressió gènica	<i>Marcadors de proliferació</i>	<i>Ki-67</i> <i>PCNA</i>	+ ^{&} + ^{&}	+++ +++	+++ ^{\$} +++ ^{\$}	+++ +++
	<i>Inhibidors de cdk</i>	<i>p27^{Kip1}</i> <i>p16^{INK4a}</i> <i>p21^{Waf1/Cip1}</i>	+++ ^{\$} - -/+ ^{\$}	+++	++(V)	++(V) + +
Productes de gens supressors tumorals		<i>pRB</i> <i>p53</i> <i>pTEN</i>	++ -/+ ^{&} +++		++ +/-	+(V) ++(M) +(V)
Apoptosi	<i>TUNEL / Cossos apoptòtics</i> <i>Bcl-2</i>		+/- +++ ^{&}	- +++ (BL)	++ -/+	++ +/- (M)
Angiogènesi	<i>Microvasos (CD31, CD34)</i> <i>Hif-1α</i>		-/+		+ +/-	+/- (V)
Molècules d'adhesió	<i>Cadherina E</i>		+++			++(V)
	<i>Cadherina P</i>		+++ (B)		+/-	-
	<i>CD44H/S</i>		+++		++(V)	++(V)
	<i>CD44v6</i>		+ ^{&}		+/-	+/-
	<i>PSCA</i>		+ ^{\$}			++
	<i>PSMA</i>		++(L)		++	+++
	<i>α-Catenina</i>		+++			+(V)
	<i>C-CAM</i>		+ ^{&}		+	-
	<i>Ep-CAM</i>		+ ^{\$}		+++	+++
Proteïnes de xoc tèrmic ("heat shock")	<i>HSP27</i>		-			++(M)
Gens supressors metastàsics	<i>KA1</i>		++			-/+
	<i>Nm23</i>		+ ^{&}		++	++

Immortalització	Activitat telomerasa	-	+(V)	+++
Factors de creixement	FGF (α , β , 8) TGF- α KGF TGF- β_1 Proteïna morfogenètica òssia 6	+(B) - - -/+ (B) +	++ +++ -/+ +	++ +++ + ++ ++
Receptors de factors de creixement	EGF-R P185 c-erbB2/HER-2-neu P180 c-erbB3 c-met receptor de la prolactina	++ ^{&} +++ ^{&} ++ ^{&} ++(B) +++	+++ +++ ++ ++ +++ (I+)	++(V) ++ ++ ++ ++
Proteïnes que s'uneixen a factors de creixement	IGFBP-2 IGFBP-3	- +++ (BL)	+++ (I-)	++(M) +++ (I-)
Receptors nuclears	Receptor d'andrògens Receptor d'estrògens	+++ ^{\$} +(B)	++ ^{\$} -/+	+++ +
Destoxificador de carcinògens	GSTP-1	+++ ^{&} +++ (BL)	-	-
Filaments intermedis	Citoqueratines 5, 14	+++ (B)	+	- -
Enzims metabolitzadors d'àcid araquidònic	15-LOX-2	+++ (L)		++ (V)
Ciclooxigenases	COX-2	+		++
Gens metabòlics	Sintetasa d'àcids grassos Apolipoproteïna D	-/+ -/+ (L)	++	+++ +++ (V)
Altres	AIPC	+++ (B)	++	+++ +++

Taula 11. Selecció de marcadors genètics i histològics implicats en la carcinogènesi prostàtica.

AIPC = activat al carcinoma de pròstata, B = específic basal, BL = tant a cèl.lules basals com luminals, CaP = adenocarcinoma, CAM = molècula d'adhesió cel.lular, COX = ciclooxigenasa, EGF = factor de creixement epidèrmic, FGF = factor de creixement fibroblàstic, GSTP-1 = glutatió-S-transferasa π , HGPIN = neoplàsia intraepitelial prostàtica d'alt grau, I+ = marcat augment de la intensitat comparat amb el normal, I- = marcada disminució de la intensitat comparada amb el normal, IGFBP = proteïna que s'uneix al factor de creixement semblant a la insulina, KGF = factor de creixement queratinocític, L = específic de cèl.lula luminal, LOX = lipooxigenasa, M = marcadament augmentat a carcinomes refractaris a hormones, PCNA = antigen nuclear de proliferació cel.lular, PIA = atròfia inflamatòria proliferativa, PSCA = antigen de cèl.lula mare prostàtica, PSMA = antigen prostàtic específic de membrana, TGF = factor de creixement transformant, TUNEL = osca de marcatge terminal mediat mitjançant dUTP in situ amb desoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt), V = variabilitat significativa entre casos, amb uns positius i d'altres negatius.

-/+ = positiu a molt poques cèl.lules, +/- = positiu en una minoria de cèl.lules, + = positiu a moltes cèl.lules, ++ = positiu a la majoria de cèl.lules, +++ = positiu a totes les cèl.lules.

(*) Les dades d'expressió s'han basat en estudis amb teixits humans exclusivament en un nivell proteic (o nivell enzimàtic per la telomerasa) utilitzant immunohistoquímica. Els marcadors s'han relacionat amb la seva expressió en epitelis d'aspecte normal (s'han exclòs les cèl.lules estromals). Donat que és un resum, només s'han inclòs els marcadors més remarcables. S'exposen els nivells d'expressió relativa, però sovint apareixen discrepàncies en relació amb el percentatge de casos positius, a més del percentatge de tinció cel.lular. Els espais en blanc indiquen que no es disposa d'informació o no es pot trobar a la base de dades Medline.

* Pel que fa a les PIN d'alt grau, les dades corresponen a les cèl.lules luminals.

Canvis detectats en epitelis d'aspecte normal amb carcinoma contra pròstates sense carcinoma.

& Basal més gran que luminal.

\$ Luminal més gran que basal.

NOUS MARCADORS POTENCIALS	
Marcadors nous	Antigen epitelial transmembrana 6 de la pròstata Caveolina-1 DD3 Transglutaminasa tissular HK2 Factor Ets derivat de la pròstata
Reguladors del desenvolupament	Nkx3.1 Hox
Gens de resposta al creixement inicial	
Proteïnes de la matriu nuclear	D-1, D-2, D-3 AM-1, AM-2, PC-1
Marcadors de lesió oxidativa	8-hidroxidesoxiguanosina timidina glicol (urinari) malondialdehid 5-hidroxi-2'-desoxicitidina

Taula 12. Altres marcadors potencialment implicats en la carcinogènesi prostàtica.

AM = adrenomedul.lina, D = polipèptid ribonucleoprotèic nuclear petit (Sn RNP Sm), DD3 = antigen de càncer prostàtic 3 (també anomenat PCA 3)

II. HIPÒTESI DE TREBALL
I OBJECTIUS

*Basant-nos en la existència comprovada d'alteracions en l'expressió de gens reguladors del cicle cel.lular, de l'apoptosi i dels agents que intervenen en l'adquisició del fenotipus metastàtic en diversos models tumorals tant "in vivo" com "in vitro", es va plantejar com **hipòtesi de treball** l'existència d'alteracions d'aquest tipus a diferents nivells, des d'una fase inicial premaligna fins a les fases més avançades metastàsiques en carcinomes prostàtics de malalts al nostre medi. Això ocasionaria alteracions de la regulació del cicle cel.lular, de la mort cel.lular programada, així com de l'adquisició del fenotipus metastàtic, amb la qual cosa influïrien en una proliferació cel.lular accelerada i podrien correlacionar-se amb característiques clínicopatològiques dels tumors.*

*Per comprovar experimentalment aquesta hipòtesi, s'han plantejat els següents **objectius**:*

1.- Estudiar les alteracions de l'expressió dels gens TP53, bcl-2 i p21^{Waf1/Cip1} com a moduladors de vies de regulació del cicle cel.lular i apoptosi, per tal d'analitzar el seu paper i la possible coincidència de les seves alteracions en carcinomes prostàtics.

2.- Determinar les possibles alteracions de l'expressió del gen supressor tumoral p27^{Kip1} en el desenvolupament i progressió de les lesions premalignes prostàtiques fins al carcinoma invasiu i metastàtic.

3.- Establir els canvis fenotípics, en quant a l'expressió de proteases que degraden la matriu extracel.lular, que pateixen les cèl.lules prostàtiques en la progressió a la premalignitat i malignitat, així com el paper regulador d'aquests mecanismes en l'apoptosi, mitjançant l'estudi de les catepsines B i S.

4.- Determinar si hi ha correlació entre aquestes alteracions i paràmetres clínicopatològics d'agressivitat, així com amb la capacitat proliferativa de les cèl.lules tumorals prostàtiques.

III. MATERIAL I MÈTODES

A. SELECCIÓ DELS TEIXITS

L'estudi s'ha realitzat a partir de l'anàlisi de 164 mostres compostes per:

a) 52 adenocarcinomes, 36 focus de PIN d'alt grau i 50 mostres de teixit normal adjacent a la tumoració, obtinguts de 52 prostatectomies radicals consecutives, corresponents a tumors primaris localitzats (estadis pT2 i pT3), que varen ser intervinguts a l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona.

b) 19 metàstasis ganglionars corresponents a biòpsies ganglionars en CP estadi T4, biòpsies ganglionars diagnosticades de CP no sospitat i necròpsies.

c) 11 mostres d'hiperplàsia nodular corresponents a peces d'adenomectomia transhipogàstrica.

Els estudis realitzats es basaren en la disponibilitat del teixit pròstatic, essent aquest aspecte d'importància cabdal pel que fa a les mostres de teixit metastàtic, on l'escassa quantitat d'aquest tipus de mostra va limitar el seu estudi a un únic marcador immunohistoquímic (p27^{Kip1}). A més, excepcionalment, l'obtenció de material de carcinoma primari i metastàtic d'un mateix pacient va ser possible en 6 casos (4 biòpsies per agulla i 2 prostatectomies radicals efectuades tot i la presència de metàstasis als ganglis limfàtics regionals estudiats preoperatòriament).

Tots els casos tenien un diagnòstic comprovat histopatològicament a la nostra institució d'adenocarcinoma de pròstata, amb material inclòs en parafina per a la pràctica d'estudis histopatològic i immunohistoquímic.

B. ESTUDI HISTOLÒGIC

B.1. OBTENCIÓ I TRANSPORT DE LA MOSTRA

Un cop realitzada la prostatectomia radical al quiròfan, es col·locà la

peça en un recipient i s'envia al Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic i Provincial en fresc o en un recipient en formol al 10 % quan es produï demora en l'enviament.

B.2. ESTUDI MACROSCÒPIC

b.2.1) Prostatectomia radical (protocol de tallat)

Es va pesar i medir la peça. S'orientà i es deixà fixar durant 24-48 hores. Es separaren les vesícules seminals i conductes deferents, amb inclusió total de les mateixes efectuant seccions transversals i assenyalant clarament el marge de resecció d'ambdós conductes deferents i la zona de transició entre el teixit prostàtic i les vesícules seminals. Es seccionà la pròstata transversalment, efectuant talls d'aproximadament 3 mm de gruix. Finalment, es realitzà la inclusió dels marges vesical i apical (uretral distal) obtenint múltiples seccions radials dels fragments. La resta de teixit prostàtic es va incloure en la seva totalitat, efectuant un megabloc ("whole mount") de la zona de tumor més evident.

b.2.2) Tallat de la resta de peces

Pel que fa a les biòpsies per agulla i els gànglis metastàsics es realitzà inclusió total del material. De les peces corresponents a prostatectomia parcial (adenomectomia transhipogàstrica per hiperplàsia de pròstata s'obteniren fins a 8 seccions representatives, en especial de les zones més sòlides i grogenques.

B.3. INCLUSIÓ DEL MATERIAL EN BLOCS DE PARAFINA

El procés va consistir en 12 pasos amb una durada total de 17 hores i 15 minuts i es realitza de manera totalment automatitzada. Els pasos inclogueren succesivament: formol al 10%, etanol 96º, etanol absolut, toluè i parafina.

B.4. OBTENCIÓ DE TALLS HISTOLÒGICS

Amb el microtom es realitzaren talls de 3 µm de gruix.

B.5. TINCIÓ I MUNTATGE DELS TALLS HISTOLÒGICS

Les preparacions es tenyiren de forma automatitzada seguint un protocol que consta de 22 passos i dura 49 minuts. Els passos inclogueren succesivament: desparafinació i rehidratació amb xilè, etanol absolut, etanol 96º, aigua, hematoxilina, aigua, aigua acètica, aigua, etanol 96º, eosina, etanol absolut, xilè-eucaliptol i xilè.

Al finalitzar aquest procés, s'obtingué la preparació histològica tenyida. Finalment, per muntar les mostres, damunt la preparació es va afegir DPX i un cubre-objectes.

C. ANÀLISI MICROSCÒPICA DELS TALLS HISTOLÒGICS I OBTENCIÓ DELS PARÀMETRES CLÍNICO-PATOLÒGICS

Les mostres obtingudes es visualitzaren amb el microscopi òptic fins arribar al diagnòstic histopatològic del tumor. Tot seguit, s'obtingueren les dades corresponents a les variables clínicopatològiques que ens interessaren en aquest estudi, les quals es resumeixen a la taula 13.

(Pàgines següents) Taula 13. Descripció de les variables clínicopatològiques.

VARIABLE	CARACTERÍSTIQUES
Edat	<ul style="list-style-type: none"> - S'inclogueren tots els casos, segons l'ordre cronològic de presentació. - Variable quantitativa discreta, en el moment de la recollida de les dades. - Variable qualitativa dicotòmica amb el punt de tall als 65 anys, en diverses proves estadístiques.
Grau Histològic	<ul style="list-style-type: none"> - S'utilitzà el sistema de gradació de Gleason combinat ("score"). - Variable quantitativa discreta, en el moment de la recollida de les dades. - Variable qualitativa dicotòmica amb el punt de tall al patró combinat 7, en diverses proves estadístiques. <p>Aquest valor és el recomanat en la literatura més recent de forma majoritària, considerant per sota de 7 les mostres com de "baix grau" i a partir de 7 considerant-les com "d'alt grau".</p>
Estadi Tumoral (T)	<ul style="list-style-type: none"> - S'utilitzà el sistema d'estadiatge recomanat pel carcinoma de pròstata per l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) i la Unió Internacional Contra el Càncer (UICC), mitjançant la classificació TNM (5^a edició, 1997) ¹²⁷. - Casos corresponents a primaris localitzats (pT2 ó pT3). - Variable qualitativa dicotòmica. Les categories corresponen a cada estadi tumoral.
Marge de Resecció	<ul style="list-style-type: none"> - Es considerarà marge positiu o afectat quan s'observaren cèl.lules canceroses en contacte amb la tinta amb la qual es delimità el marge durant el processament macroscòpic de la peça. - Variable qualitativa dicotòmica, en la qual una categoria contenia les mostres amb marge lliure i l'altra amb les mostres amb marge afectat.
Invasió Perineural	<ul style="list-style-type: none"> - Es considerarà "invasió perineural" la presència de cèl.lules tumorals en una localització perineural circumferencial i/o intraneural, tant intraprostàtica com extraprostàtica. - Variable qualitativa dicotòmica. Les categories corresponen a absència o presència d'invasió perineural.

<p>Invasió de Vesícules Seminals</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Només avaluada en els casos amb estadi pT3. - Es considerarà que una vesícula seminal com a envaïda quan s'afecta la capa muscular de la vesícula seminal i no només l'adventícia. - Variable qualitativa dicotòmica. Les categories corresponen a absència o presència d'invasió de vesícules seminals.
<p>Metàstasi Ganglionars (N)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - S'incloquen els casos amb metàstasi ganglionar detectada en l'estudi histològic. - Variable qualitativa dicotòmica. Les categories corresponen a absència o presència de metàstasi ganglionar detectada (N₀, N₁).
<p>PSA Preoperatori</p>	<ul style="list-style-type: none"> - S'ha avaluat a partir de la darrera determinació sèrica del PSA abans del tractament. - Variable quantitativa contínua, en el moment de la recollida de les dades. - Variable qualitativa dicotòmica. Es considerarà com a punt de tall 20 ng/ml, d'acord amb dades de la literatura mèdica que consideraren que a partir d'aquest valor el risc de presentar metàstasi òssies era destacable ³⁰⁵.
<p>Recidiva del PSA</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Es considerarà l'aparició de recidiva quan els nivells de PSA augmentaren de més de 0,4 ng/ml en relació amb els obtinguts just després de la prostatectomia radical, d'acord amb estudis previs ³⁰⁶. - Variable qualitativa dicotòmica. Les categories corresponen a absència o presència de recidiva.
<p>Moment de la Recidiva del PSA</p>	<ul style="list-style-type: none"> - S'han avaluat els nivells de PSA en cadascun dels controls de seguiment de la malaltia. - Variable quantitativa discreta, en el moment de la recollida de les dades, considerant el mes en el qual s'efectua el control del PSA. - Variable qualitativa dicotòmica. Les categories es correspongueren amb un punt de tall als 6 mesos, valor més aproximat a la mediana de la mostra.
<p>Tractament Previ</p>	<ul style="list-style-type: none"> - S'incloquen els casos amb qualsevol tipus de tractament previ a la prostatectomia radical. - Variable qualitativa dicotòmica. Les categories corresponen a absència o no de tractament previ.

D. ANÀLISI DE LA PLOIDIA I LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

La determinació de la ploidia cel·lular i l'anàlisi de la fase S, per tal de quantificar el contingut d'ADN, es realitzà amb el citòmetre de flux Coulter Epics-Profile II (Coulter Electronics), sobre seccions de material fixat en formol i inclòs en parafina, i usant un programa Multicycle (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA (EUA)), basat en el mètode matemàtic descrit per Dean i Jett³⁰⁷. Per estudiar la proliferació cel·lular es determinà la fase S global en tots els casos independentment de la seva ploidia. A més, en els casos amb presència de població aneuploide es determina la fase S corresponent a aquesta subpoblació.

Les característiques corresponents a aquestes variables es resumeixen a la taula de la pàgina següent.

VARIABLE	CARACTERÍSTIQUES
Ploidia	<p>En l'avaluació de la ploidia cel.lular s'han considerat les següents possibilitats:</p> <ul style="list-style-type: none"> . <u>Diploidia</u>: quan només s'observa un pic d'ADN nuclear a la regió diploide (2c) amb un coeficient DI (Índex d'ADN, és a dir, la fracció de població G_0/G_1 / fracció població diploide de referència) entre 0,95 i 1,05. . <u>Tetraploidia</u>: quan s'identifica un segon pic que es caracteritza per la presència de > 15 % dels nuclis a la regió tetraploide (4c), amb un coeficient DI entre 1,95 i 2,05. . <u>Aneuploidia</u>: quan s'identifica un tercer pic prominent entre la regió diploide (2c) i la tetraploide (4c), amb un coeficient DI entre 1,05 i 1,95. <p>Donada la raresa de tumors hipodiploides, per conveni ³⁰⁸, quan s'identifica més d'un pic es considerarà el primer com a diploide i va servir per calcular la ploidia i el coeficient de variació (CV). Es considerarà valorable un $CV \leq 8$ ³⁰⁸.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Variable qualitativa dicotòmica. Una categoria està composta per les mostres diploides i la restant per les mostres aneuploides i tetraploides. <p>L'escàs nombre de mostres no diploides ha fet que s'agrupin en una sola categoria, per tal d'obtenir millors resultats estadístics.</p>
Fase S Global	<ul style="list-style-type: none"> - Inclou el percentatge considerant la totalitat de cèl.lules de la mostra que es troben a la fase S del cicle cel.lular. - Variable quantitativa continua, el valor de la qual és calculada pel citòmetre de flux. - Variable qualitativa dicotòmica amb el punt de tall a 3,50, obtingut a partir de la mediana de la mostra.
Fase S Aneuploide	<ul style="list-style-type: none"> - Inclou el percentatge considerant només la subpoblació de cèl.lules tumorals aneuploides que es troben a la fase S del cicle cel.lular. - Variable quantitativa contínua, el valor de la qual és calculada pel citòmetre de flux. - Variable qualitativa dicotòmica amb el punt de tall a 3,50, a l'igual que la fase S global, encara que en aquest cas la mediana fou de 2,90.

Taula 14. Descripció de les variables relacionades amb ploidia i proliferació cel.lular.

La tècnica utilitzada fou una modificació de la tècnica original de Hedley, d'ús habitual en teixits obtinguts a partir de blocs de parafina³⁰⁹:

PAS	ACCIÓ
1	<i>Tallar el bloc de parafina a 50 µm de gruix, per tal d'obtenir un mínim de 10.000 nuclis cel.lulars (valor mínim que es considera per considerar una mostra com avaluable, segons els criteris de consens de l'any 1993)³⁰⁸.</i>
2	<i>Posar el tall en un tub de vidre per a desparafinar-lo.</i>
3	<i>Afegir-hi 5 ml de xilè i deixar-ho 20 minuts.</i>
4	<i>Eliminar el xilè per decantació, amb cura de no perdre teixit.</i>
5	<i>Repetir els passos 3 i 4 fins a un total de 5 vegades.</i>
6	<i>Afegir-hi 5 ml, d'etanol absolut i decantar-lo. Aquest rentat s'ha de fer 3 cops.</i>
7	<i>Afegir-hi 3 ml d'etanol absolut.</i>
8	<i>Per a la hidratació es van afegint al tub les quantitats d'aigua necessàries per a assolir seqüencialment les concentracions convenients d'etanol. Afegir-hi 160 µm d'aigua per a obtenir etanol de 95% i deixar-ho 2 minuts.</i>
9	<i>Afegir-hi 1,13 ml d'aigua per obtenir etanol de 70% i deixar-ho 2 minuts.</i>
10	<i>Afegir-hi 1,71 ml d'aigua per a obtenir etanol de 50% i deixar-ho 2 minuts.</i>
11	<i>Decantar-ho i afegir-hi 5 ml d'aigua destil.lada, decantar-ho i repetir aquest rentat amb aigua 3 vegades. Deixar-ho amb aigua destil.lada fins l'endemà.</i>
12	<i>Treure el tall de l'aigua, posar-lo en una placa de Petri i, sense que s'assequi, triturar-lo amb fulles de bisturí, passar-la a un tub Eppendorf i afegir-hi 1 ml. de pepsina al 0,5% en solució salina al 0,9% (sèrum fisiològic) amb el pH ajustat a 1,3-1,5 amb àcid clorhídric 1 N. (Cal netejar bé el bisturí i la placa de Petri per a evitar la contaminació d'una mostra amb fragments de l'anterior).</i>

13	<i>Agitar-ho bé amb un mesclador i incubar-ho en bany d'aigua a 37°C durant el temps que calgui segons el teixit que es processa (normalment 90 minuts), amb agitació amb el mesclador cada 15 minuts.</i>
14	<i>Quan s'ha exhaurit el temps d'incubació, treure els tubs del bany, agitar-los amb el mesclador i centrifugar-los durant 10 minuts a 2.000 rpm.</i>
15	<i>Descartar el sobrenadant en una pipeta Pasteur i resuspendre el sediment amb 1 ml. de solució de Iodur de Propidi i RNAsa (*) diluïda 1/10 amb PBS. Agitar amb el mesclador, embolicar-ho amb paper d'alumini i deixar-ho a temperatura ambient 30 minuts. Incubar-ho en nevera a 4°C fins l'endemà.</i>
16	<i>Filtrar-ho amb malla de nylon de porus de 50 µm i seguidament passar la mostra pel citòmetre.</i>

Taula 15. Mètode de Hedley modificat.

() Solució d'iodur de Propidi i RNAasa 10X:*

- Aigua destil.lada (250 ml)
- Citrat sòdic . 2 H₂O (250 ml)
- Tetraclorur d'espermina (420,5 mg)
- Trizma (15,125 mg)
- Nonidet P40 (250 ml)
- Iodur de Propidi (104 mg)
- RNAsa (7,5 mg)

Fer alíquotes de 10 ml i conservar a -40° C fins al seu ús.

E. DETERMINACIONS EXPERIMENTALS

E.1. JUSTIFICACIÓ DE L'ELECCIÓ DELS MÈTODES D'ESTUDI

e.1.1) p53:

La proteïna p53 nativa té una vida mitjana curta i és habitualment indetectable utilitzant tècniques immunohistoquímiques. No obstant, quan s'altera el gen TP53 freqüentment dona lloc a una proteïna anòmala i inactiva que s'acumula al nucli, per la qual cosa pot ser detectada per immunohistoquímica. Malgrat tot això, aquesta tècnica no és perfecta donat

que existeix la possibilitat de mutacions puntuals o deleccions que comportin l'absència de proteïna.

e.1.2) Bcl-2

Alteracions genòmiques en el gen *bcl-2* s'han detectat infreqüentment a les neoplàsies malignes humanes, a excepció d'alguns tipus de limfomes, per la qual cosa el mètode escollit per la valoració de l'expressió proteica fou la immunohistoquímica.

e.1.3) p21^{Waf1/Cip1}

Alteracions genòmiques en el gen *p21^{Waf1/Cip1}* no són massa freqüents a les neoplàsies malignes humanes, per la qual cosa el mètode escollit per la valoració de l'expressió proteica fou la immunohistoquímica.

e.1.4) p27^{Kip1}

Alteracions genòmiques en el gen de *p27^{Kip1}* s'han detectat infreqüentment a les neoplàsies malignes humanes. A més, la regulació d'aquesta proteïna es bàsicament posttranscripcional, tant a nivell traduccional com, sobretot, entre la traducció i la degradació proteica, per la qual cosa el mètode escollit per la valoració de l'expressió proteica fou la immunohistoquímica.

e.1.5) Catepsina B i S

Una abordatge immunohistoquímic de l'expressió d'aquests tipus de proteases ha estat considerat obligat, donada la presència promíscua de macròfags en teixits normals i neoplàsics en els quals, tècniques de biologia molecular com els extractes d'immunoblot, Northern blot o RT-PCR podrien estar més probablement contaminats pels seus productes no tumorals

A tot això, cal afegir la freqüent multifocalitat dels carcinomes

prostàtics i dels focus de PIN, que requereix una avaluació microscòpica, essent aquesta també aplicable als marcadors anteriors.

E.2. TÈCNICA IMMUNOHISTOQUÍMICA

Es realitzà estudi immunohistoquímic dels gens supressors $p21^{Waf1/Cip1}$ i $p27^{Kip1}$, dels gens reguladors de l'apoptosi $bcl-2$ i $p53$, i de les catepsines B i S.

e.2.1) Característiques generals dels anticossos

El anticossos utilitzats foren monoclonals, obtinguts a partir de ratolí, a excepció dels anticossos anti-catepsina, que foren policlonals i obtinguts a partir de conill. En el cas de l'anticòs anti- $p53$, s'utilitzà el clon BP53-12, que detecta tant la forma nativa com la mutada de $p53$ ³¹⁰.

ANTICOSSOS ESPECIFICITAT	CLON	CASA COMERCIAL	DIL.LUCIÓ	LOCALITZACIÓ PRIMARIS
anti-p53	BP53-12	Novocastra Newcastle upon Tyne, Anglaterra	1/50	Nuclear
anti-Bcl-2	124	DAKO Glostrup, Dinamarca	1/50	Citoplasmàtica
anti-p21^{Waf1/Cip1}	EA-10	Oncogene Sciences Inc. Cambridge, MA, EUA	1/20	Nuclear
anti-p27^{Kip1}	DCS-72.F6	Neomarkers Freemont, CA, EUA	1/200	Nuclear
anti-catepsina B	Policlonal	Anticòs no comercial Cortesia de la Dra. Bonnie F. Sloane (Detroit, EUA)	0,004 µm/ml	Citoplasmàtica
anti-catepsina S	Policlonal	Anticòs no comercial Cortesia del Dr. Guo- Ping Shi (Boston, EUA).	0,008 µm/ml	Citoplasmàtica

(Pàgina anterior). Taula 16. Característiques dels anticossos utilitzats.

e.2.2) Protocol del mètode immunohistoquímic

L'estudi immunohistoquímic es realitzà amb material fixat en formol i inclòs en parafina, sobre seccions de 2-3 µm col·locades en preparacions recobertes de silà.

Es van utilitzar diferents mètodes immunohistoquímics donat que els experiments es realitzaren en diferents moments i es va anar adoptant el mètode més sensible disponible en cada ocasió.

*El mètode utilitzat per l'estudi immunohistoquímic de la **catepsina B** i la **catepsina S** fou el del complex d'avidina-biotina (ABC) (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA (EUA)) amb revelat de peroxidasa-diaminobenzidina per la Catepsina B i fosfatasa alcalina-fast red per la Catepsina S.*

*El mètode utilitzat per l'estudi immunohistoquímic de **p21^{Waf1/Cip1}** i **p27^{Kip1}** fou el mètode d'estreptavidina-biotina (LSAB) (Biogenex Supersensitive Kit) amb revelat de fosfatasa alcalina - fast red.*

*El mètode utilitzat per l'estudi immunohistoquímic de **p53** i **Bcl-2** fou el mètode Envision+™ de DAKO, mitjançant un sistema automatitzat DAKO Techmate 500, amb revelat de peroxidasa-diaminobenzidina.*

*En el moment de realitzar els experiments, els anticossos contra la **catepsina B** i la **catepsina S** no es trobaven comercialment en el mercat. Per la qual cosa, es van obtenir de centres als Estats Units amb més experiència en aquestes dues catepsines. Així, la catepsina B va ser subministrada per la Dra. Bonnie F. Sloane de la Wayne State University de Detroit i la catepsina S fou obtinguda del Dr. Guo-Ping Shi de la Facultat de Medicina de la Universitat de Harvard a Boston. Protocols d'obtenció i purificació d'aquests anticossos*

es poden trobar publicats a la literatura^{245, 311}.

a) Protocol dels mètodes ABC i LSAB:

PAS	ACCIÓ
1	Obtenció de talls que es deixen a l'estufa a 37 °C tota la nit
2	Desparafinació i rehidratació : Xilè 10 min, xilè 5 min, xilè 5 min, etanol absolut 5 min, etanol 96° 5 min, etanol 80° 5 min, etanol 70° 5 min. Posteriorment rehidratar amb aigua bidestil.lada.
3	Desenmascarament antigènic: (p21 ^{Waf1/Cip1} , p27 ^{Kip1}) Mitjançant un pretractament calentant en un forn microones a 900 W durant 10 min, en 1500 ml d'una solució tamponada de citrat sòdic DAKO ChemMate 10 mmol/l (DAKO, Glostrup, DK). Deixar reposar en PBS. (Cat B, Cat S) No es va realitzar desenmascarament antigènic.
4	Inhibició de la peroxidasa endògena: (Cat B) Durant 20 minuts. Amb 250 ml de metanol i 5 ml de H ₂ O ₂ al 30%. Posteriorment, es realitzen 2 rentats de PBS de 5 minuts cadascún. (p21 ^{Waf1/Cip1} , p27 ^{Kip1} , Cat S) Només realitzar 2 rentats de PBS de 5 minuts cadascún. Es passa directament al pas 5, donat que no s'utilitza peroxidasa sino fosfatasa alcalina en la tècnica immunohistoquímica realitzada.
5	Supressió del fons: Incubació amb sèrum humà a una dilució 1/20 en PBS durant 20 minuts a temperatura ambient.
6	Incubació amb anticossos primaris: Prèviament, diluir els anticossos primaris en PBS. Incubació de les seccions amb l'anticòs primari tota la nit a 4° C en cambra humida. Posteriorment, es renta 3 cops amb PBS durant 5 minuts cadascún.

7	<p>Incubació amb anticòs biotinat:</p> <p>Utilitzar un anticòs secundari biotinat (DAKO) diluït 1/400 en PBS, al qual s'afegeix el doble de la quantitat de supressor (sèrum humà). El temps d'incubació és de 30 minuts a temperatura ambient en cambra humida. Posteriorment, es realitzen 2 rentats de PBS de 5 minuts cadascún.</p>
8	<p>(p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1}) Incubació amb estreptavidina-fosfatasa alcalina: S'utilitza estreptavidina-fosfatasa alcalina (Biogenex Supersensitive Kit) a una dilució 1/20 en PBS, durant 30 minuts a temperatura ambient i posteriorment es realitzen 2 rentats de 5 minuts amb PBS.</p> <p>(Cat B, Cat S) Incubació amb avidina-fosfatasa alcalina: S'utilitza avidina-fosfatasa alcalina (Vectastain ABC kit) a una dilució de 1/20 durant 30 minuts a temperatura ambient. Posteriorment, es realitzaren 2 rentats de 5 minuts amb PBS.</p>
9	<p>Revelat:</p> <p>(Cat B) S'utilitza una solució de diaminobenzidina i peròxid d'hidrogen com a cromogen (*) i es revela durant 7 minuts a temperatura ambient. Posteriorment, rentar amb aigua bidestil.lada.</p> <p>(p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1}, cat S) Utilitzar fast red com a cromogen, revelar durant un mínim de 15 minuts i un màxim de 30, a temperatura ambient, i posteriorment rentar amb PBS.</p>
10	<p>Contrastar amb hematoxilina de Gill durant uns 20 segons i rentar amb aigua de l'aixeta. Seguidament, passar per aigua acètica 20 segons i rentar amb aigua de l'aixeta.</p>
11	<p>(Cat B) Deshidratar utilitzant el protocol invers: Etanol 70° 5 min, etanol 80° 5 min, etanol 96° 5 min, etanol absolut 5 min, xilè 5 min, xilè 5 min, xilè 5 min. Seguidament, muntar amb DPX (Sigma).</p> <p>(p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1}, Cat S) Sense deshidratar, vessar 1 gota de medi acuós (Cristal Mount, Biomeda Labs). Quan s'assequi, muntar amb DPX (Sigma).</p>

Taula 17. Mètodes ABC i LSAB

b) Protocol del mètode Envision+ amb peroxidasa:

PAS	ACCIÓ
1	Obtenció de talls que es deixen a l'estufa a 37 °C tota la nit
2	Desparafinació i rehidratació: Xilè 10 min, xilè 5 min, etanol absolut 5 min, etanol absolut 5 min, etanol 96° 5 min, etanol 96° 5 min. Posteriorment rehidratar amb aigua bidestil.lada un mínim de 5 minuts i després deixar en PBS fins al desenmascarament.
3	Desenmascarament antigènic: Mitjançant un pretractament calentant en olla a pressió durant 5 min en 2000 ml d'una solució tamponada de citrat sòdic DAKO ChemMate 10 mmol/l (DAKO, Glostrup, DK). Es deixa reposar durant 15 minuts. Posteriorment, deixar en PBS fins a la incubació.
4	Incubació amb anticossos primaris: Prèviament, diluir l'anticòs primari a l'Antibody Diluent per a Dako ChemMate (**). Incubació de les seccions amb l'anticòs primari durant 1 hora a temperatura ambient. Posteriorment, es realitzen 2 rentats amb PBS de 5 minuts cadascun.
5	Inhibició de la peroxidasa endògena Amb 3 gotes de la Peroxidase Blocking Solution (DAKO Envision Kit, botella 1) durant 7 minuts. Posteriorment, es realitzen 2 rentats de PBS de 5 minuts cadascun.
6	Incubació amb el mètode Envision+ Amb 3 gotes del Labelled Polymer (DAKO Envision Kit, botella 2) durant 30 minuts. Posteriorment, es realitzen 2 rentats de PBS de 5 minuts cadascun.

7	<p>Revelat amb una solució de diaminobenzidina i peròxid d'hidrogen (**), preparada abans del revelat:</p> <p>Es revela seguint el següent protocol: Solució de revelat 2 min 30, PBS 5 min, Solució de revelat 2 min 30, PBS 5 min, Solució de revelat 2 min 30. Posteriorment, es realitzen 2 rentats amb PBS de 5 minuts cadascun.</p>
8	<p>Contrastar amb hematoxilina de Gill (Merck) durant uns 20 segons i rentar amb aigua de l'aixeta. Seguidament, passar per aigua acètica 20 segons i rentar amb aigua de l'aixeta.</p>
9	<p>Deshidratar utilitzant el següent protocol:</p> <p>Etanol 50°, Etanol 96°, Etanol 96°, Etanol absolut, Etanol absolut, Xilè, Xilè, Xilè. Durada total del protocol: fins a 5 minuts. Seguidament, muntar amb DPX (Sigma).</p>

Taula 18. Mètode Envision+ amb peroxidasa

(*) Solució de treball:

- Diaminobenzidina (DAB) (300 µl)
- Peròxid d'hidrogen al 3% (300 µl)
- PBS (5 ml)

Conservar a -20°C.

(**) Composició de l'Antibody Diluent per Dako ChemMate:

Tris Buffer pH 7.2, que conté 15 mmol/l de NaN₃ i proteïna.
Conservar a la nevera.

(***) Solució de treball:

- DAB + cromogen (DAKO Envision Kit, botella 3b)
- Tampó (DAKO Envision Kit, botella 3a)

Preparar amb 1 gota de DAB + cromogen per cada 1 ml de tampó. Guardar a la nevera fins al seu ús.

e.2.3) Controls

Paral·lelament, s'utilitzaren controls positius i negatius per descartar qualsevol expressió no específica de l'anticòs primari. La taula de la pàgina següent resumeix els controls utilitzats per cadascun dels anticossos.

MARCADOR	CONTROL POSITIU	CONTROL NEGATIU	CONTROL INTERN POSITIU
p53	Casos comprovats d'expressió de la proteïna a <u>carcinomes de laringe</u> ³¹²	Substitució de l'anticòs primari per la fracció d'IgG de sèrum de ratolí a la mateixa concentració, mantenint les mateixes condicions en tot el procés	-----
Bcl-2	Casos diagnosticats a l'Hospital Clínic i amb expressió comprovada de la proteïna a <u>limfomes fol·liculars</u>	Substitució de l'anticòs primari per la fracció d'IgG de sèrum de ratolí a la mateixa concentració, mantenint les mateixes condicions en tot el procés	Limfòcits
p21^{Waf1/Cip1}	Casos comprovats d'expressió de la proteïna a <u>carcinomes de mama</u> ³¹³	Substitució de l'anticòs primari per la fracció d'IgG de sèrum de ratolí a la mateixa concentració, mantenint les mateixes condicions en tot el procés	-----
p27^{Kip1}	Casos comprovats d'expressió de la proteïna a <u>ganglis limfàtics reactius</u> ³¹⁴	Substitució de l'anticòs primari per la fracció d'IgG de sèrum de ratolí a la mateixa concentració, mantenint les mateixes condicions en tot el procés	Limfòcits
Catepsina B	Casos comprovats d'expressió de la proteïna a <u>carcinomes de colon</u> ²⁵²	Substitució de l'anticòs primari per la fracció d'IgG de sèrum de conill a la mateixa concentració, mantenint les mateixes condicions en tot el procés	Macròfags

Catepsina S	Casos comprovats d'expressió de la proteïna a histiòcits de la <u>melsa</u> ²⁵⁶	Substitució de l'anticòs primari per la fracció d'IgG de sèrum de conill a la mateixa concentració, mantenint les mateixes condicions en tot el procés	Macròfags prostàtics
------------------------	--	--	----------------------

Taula 19. Controls per cada anticòs.

e.2.4) Valoració

En línies generals, l'elecció del punt de tall emprat per l'estudi de cadascún dels anticossos com a variables dicotòmiques es basà en els utilitzats amb anterioritat en estudis relacionats amb el tema d'aquesta tesi ^{276, 315-320} i també en la seva aportació per obtenir relacions significatives entre la variable problema i la resta de variables.

a) p53:

Es va avaluar com a variable qualitativa, donats els resultats obtinguts, com s'explicarà posteriorment, amb un baix nombre de casos marcadament positius. La tinció nuclear de les mostres de carcinoma i normals es valorà mitjançant la proporció de cèl.lules amb positivitat intranuclear en 10 camps de gran augment (x400) a les zones més tenyides. En les mostres de PIN es valorà la totalitat del teixit amb aquestes característiques. Es considerà l'expressió de p53 com a negativa quan la immunotinció nuclear fou totalment absent. La positivitat de p53 s'avaluà de forma semiquantitativa establint inicialment tres intervals: <1 %, 1-10 % o més del 10% de les cèl.lules. No es considerà la tinció del citoplasma de p53.

b) Bcl-2:

Es va avaluar com a variable qualitativa, degut a la dificultat derivada de la quantificació de l'expressió de Bcl-2 en una localització citoplasmàtica,

amb límits pitjor definits respecte a les tincions clarament nuclears. En les mostres de carcinoma i teixit normal, la valoració de la tinció citoplasmàtica es feu mitjançant la proporció de cèl.lules amb positivitat intracitoplasmàtica en 10 camps de gran augment (x400) a les zones més tenyides. En les mostres de PIN, es valorà la totalitat del teixit d'aquestes característiques Els casos es classificaren de forma semiquantitativa com a positius (presència de cèl.lules positives) o negatius (absència de cèl.lules positives).

c) p21^{Waf1/Cip1}.

Es va avaluar com a variable quantitativa, donat el seu patró d'expressió ben definit, de localització nuclear. En les mostres de carcinoma i de teixit normal la quantificació de la tinció nuclear es valorà mitjançant el percentatge de cèl.lules amb positivitat intranuclear en 10 camps de gran augment (x400) a les zones més tenyides, després de contar almenys 500 cèl.lules. Per avaluar les mostres de PIN es consideraren la totalitat de cèl.lules premalignes, sovint presents en un nombre menor de 500. Els casos es classificaren com a positius ($\geq 5\%$ de cèl.lules positives) o negatius ($< 5\%$ de cèl.lules positives). La tinció citoplasmàtica no fou valorada donat que no està demostrada la utilitat de la seva interpretació.

d) p27^{Kip1}.

Es va avaluar com a variable quantitativa, donat el seu patró d'expressió ben definit, de localització nuclear. En les mostres de carcinoma, de teixit normal i hiperplàsic, la quantificació de la tinció nuclear es valorà mitjançant el percentatge de cèl.lules amb positivitat intranuclear en 10 camps de gran augment (x400) a les zones més tenyides, després de contar 500 cèl.lules. Per avaluar les mostres de PIN i metàstasi es consideraren la totalitat de cèl.lules premalignes, sovint presents en un nombre menor de 500. Els casos es van classificar inicialment com a expressors baixos i alts quan el nombre de cèl.lules positives fou del 0-50 % o més del 50% respectivament^{276, 281, 319}. També, diverses publicacions han demostrat la utilitat del punt de tall definit en el 30% de les cèl.lules positives, el qual afegí informació addicional

e) Catepsines B i S:

Es va avaluar com a variable qualitativa, degut a la dificultat derivada de l'expressió d'aquestes catepsines en una localització citoplasmàtica, amb límits pitjor definits respecte a les tincions clarament nuclears. La tinció citoplasmàtica de les mostres de carcinoma i teixit normal es valorà mitjançant la proporció de cèl.lules amb tinció intracitoplasmàtica positiva en 10 camps de gran augment (x400) a les zones més tenyides. En les mostres de PIN es valorà la totalitat de teixit amb aquestes característiques. Tant en el cas de la catepsina B com la S, es considerà l'expressió com a negativa quan fou totalment absent. La positivitat d'ambdues catepsines s'avaluà de forma semiquantitativa establint inicialment 3 intervals: < 10%, 10-50 %, > 50% de les cèl.lules. A més, en aquestos marcadors, s'avaluà també la intensitat de la tinció utilitzant una gradació semiquantitativa amb intensitats que anaren des de dèbil (+) fins a forta (+++).

F. ANÀLISI ESTADÍSTICA

L'estudi estadístic es va realitzar amb el paquet de "software" estadístic SPSS 7.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) a partir de resultats previament introduïts en una base de dades dissenyada amb el programa Access 97 del paquet ofimàtic Microsoft Office 97 (Microsoft Corp.). Els resultats es van considerar significatius amb un risc alfa de 0,05.

En primer lloc, es realitzà un breu estudi descriptiu de les 20 variables de l'estudi, 6 de les quals eren experimentals (i corresponien a les tincions immunohistoquímiques) i 14 eren no experimentals (corresponent als paràmetres clínicopatològics: grau, estadi, proliferació, etc.). Es va obtenir la mitjana i el rang de les variables quantitatives, així com el percentatge de casos corresponents a cada categoria, pel que fa a les variables qualitatives

dicotòmiques. En aquest moment, en les variables quantitatives, es va comprovar la normalitat mitjançant la prova de Kolmogorov-Smirnov i la homocedasticitat amb la prova de Levene.

Tot seguit, es començà la comparació dels resultats experimentals amb els diferents paràmetres clínico-patològics. També s'estudiaren els resultats experimentals entre si, per tal d'intentar obtenir patrons combinats d'expressió dels marcadors immunohistoquímics. Finalment, i de manera breu, es compararen entre sí els diferents paràmetres clínico-patològics, per tal de trobar dades que poguessin ser rellevants per l'estudi dels diversos marcadors immunohistoquímics.

Per valorar la relació entre dues variables quantitatives, s'utilitzà el coeficient de correlació de Pearson i, com a prova no paramètrica, el coeficient de correlació rho de Spearman.

Amb la finalitat de comparar dues categories corresponents a una variable qualitativa en relació amb una variable quantitativa, s'utilitzà la prova de comparació de mitjanes t de Student-Fisher, amb la qual, a més, es calculà l'interval de confiança i l'error estàndar de la mitjana. Donada la impossibilitat d'estudiar exactament les mateixes cèl·lules amb tots els marcadors immunohistoquímics, fet especialment remarcable pel que fa a l'estudi de lesions de mida molt petita (com la PIN) que comportava la presència d'una mateixa lesió en una o dues preparacions histològiques, només es va realitzar l'estudi mitjançant un diseny de dades independents i, en cap cas, amb dades aparellades. Finalment, quan calgué utilitzar una prova no paramètrica, per no complir-se les condicions d'aplicació, es va fer amb la prova U de Mann-Whitney.

Per tal d'estudiar les freqüències observades en relació amb les esperades a les diferents categories de les variables qualitatives, s'utilitzà la prova de khi al quadrat (χ^2). Les condicions d'aplicació emprades van ser que els casos esperats fossin més grans de 5 en un 80% dels casos com a mínim i que mai s'observés un nombre de casos esperats inferior a 2 ³²³.

Inicialment, es van assignar a algunes de les variables qualitatives un nombre de categories més gran de 2. Tanmateix, la impossibilitat de no poder utilitzar la prova de khi al quadrat en un gran nombre de casos va obligar a la dicotomització d'aquestes variables, amb la consegüent construcció de taules de contingència 2x2 i l'aplicació de la prova exacta de Fisher.

Finalment, es van intentar explorar les associacions entre dues variables controlant els efectes d'altres variables que poguessin actuar com a factors de confusió, mitjançant la transformació de les variables qualitatives en quantitatives i la posterior anàlisi de les correlacions parcials entre les diferents variables³²⁴.

IV. RESULTATS

A. ANÀLISI DELS PARÀMETRES CLÍNICO-PATOLÒGICS

A.1. ANÀLISI DESCRIPTIVA DELS PARÀMETRES CLÍNICO-PATOLÒGICS

S´analitzà l´edat en tots els tipus de mostres. La resta de variables clínicopatològiques només s´han estudiat a les mostres de carcinoma.

a.1.1) edat

Les mostres obtingudes a partir de prostatectomies radicals, i amb les quals es van estudiar teixits normals, PIN i carcinomes, corresponen a homes amb edats compreses entre els 46 i els 75 anys. L´edat mitjana fou de 64,03 anys i la mediana de les edats de 65,50 anys. Aquesta mostra estava composta de 2 casos (4 %) menors de 50 anys, 14 casos (27 %) entre 51 i 60 anys, 31 casos (60 %) entre 61 i 70 anys i 5 casos (10 %) en homes de més de 70 anys.

L´edat mitjana de les mostres d´hiperplàsia fou més elevada (68,90 anys), probablement perquè es van incloure mostres de malalts més grans de 80 anys, en els quals no estava contraindicada la adenomectomia prostàtica. En canvi, l´edat mitjana de les mostres de metàstasi fou molt semblant (64,36 anys) a la de les mostres de carcinoma.

Tanmateix, es buscaren possibles diferències, que poguessin atribuir-se a la pertinença a diferents poblacions, entre les mitjanes de les edats de les mostres de carcinoma, metàstasi i hiperplàsia, sense detectar-ne cap. Per tant, fent referència a l´edat, les dades obtingudes no recolzen que les mostres d´hiperplàsia, carcinoma i metàstasi pertanyin a poblacions que puguin ser comparables entre sí, malgrat la diferència en el nombre de casos de cada tipus de mostres.

a.1.2) Resta de variables clínico-patològiques

A la taula 20 es resumeixen els resultats corresponents a la resta de paràmetres clínico-patològics:

VARIABLE	CARCINOMA
Nombre de pacients	52
Edat (anys)	64,03 (46-75)*
≤ 65	26 (50,0)
> 65	26 (50,0)
Grau (Gleason)	
2 - 6	28 (53,8)
7 - 10	24 (46,2)
Estadi (patològic)	
pT2	33 (63,5)
pT3	19 (36,5)
Marge de resecció	
Lliure	24 (46,2)
Afectat	28 (53,8)
Invasió perineural	
No	29 (55,8)
Sí	23 (44,2)
Invasió de seminals (només pT3)	
No	11 (57,9)
Sí	8 (42,1)
Metàstasis ganglionars	
No	31 (86,1)
Sí	5 (13,9)
PSA preoperatori	13,4 (1.29-39.0)*
< 20	35 (76,1)
≥ 20	11 (23,9)
Recidiva PSA	
No	23 (57,5)
Sí	17 (42,5)
Moment de la recidiva del PSA	(1-42)**
≤ 6 mesos	9 (52,9)
> 6 mesos	8 (47,1)
Tractament previ	
No	37 (78,7)
Sí	10 (21,3)

Taula 20. Resum descriptiu de la resta de variables clínico-patològiques en els casos de carcinoma (Nº de pacients i percentatge).

* Mitjana; entre parèntesis valors mínim i màxim. ** Només valors mínim i màxim.

A.2. ANÀLISI DELS PARÀMETRES CLÍNICO-PATOLÒGICS ENTRE SI

L'anàlisi de les diferents variables clínicopatològiques entre si reportà diferències significatives ($p < 0,05$) o quasi significatives ($p < 0,10$) en algunes ocasions, les quals queden resumides al final de l'apartat, a la taula 21.

La relació entre aquestes variables fou directa en tots els casos excepte quan es va relacionar el PSA preoperatori amb el moment de la recidiva del PSA i l'edat amb l'aparició de metàstasis ganglionars, on l'associació fou inversament significativa.

a.2.1) Relació entre grau tumoral i estadi tumoral

Es van avaluar tots els casos (52) de la mostra de tumors primaris. La majoria dels casos (26 de 28) (93 %) amb grau de Gleason baix tingueren un estadi tumoral pT2 i la majoria dels casos (17 de 24) (71 %) amb grau de Gleason alt van tenir un estadi tumoral pT3. Per tant, s'observà una relació directa entre l'augment del grau tumoral i un estadi tumoral més avançat ($p < 0,001$).

a.2.2) Relació entre grau tumoral i metàstasis ganglionars

S'avaluaren un total de 36 mostres. Tots els casos amb metàstasis ganglionars (14 %) presentaren un grau de Gleason alt. D'altra banda, només 13 casos sense metàstasis ganglionars (42 %) foren d'alt grau. Malgrat l'escàs nombre de mostres amb metàstasis ganglionars, tot això evidència un augment de les metàstasis ganglionars en el grup de mostres amb un alt grau tumoral respecte al grup amb un baix grau tumoral ($p = 0,045$).

a.2.3) Relació entre grau tumoral i PSA preoperatori

S'avaluaren un total de 46 mostres. En 9 casos de 24 (38 %) amb un grau de Gleason alt, els nivells de PSA preoperatori foren superiors a 20 ng/ml. En canvi, només en 2 casos de 22 (9 %) aquests nivells foren alts en el grup de tumors amb un grau baix de Gleason. Per tant, s'observa una relació directa entre l'augment dels nivells de PSA preoperatori i el grau tumoral ($p = 0,024$).

a.2.4) Relació entre grau tumoral i recidiva dels nivells de PSA

S'avaluaren un total de 40 mostres. S'evidencià un augment de nivells del PSA postcirurgia en 12 casos (71 %) de tumors d'alt grau, però només en 9 casos (39 %) dels tumors de baix grau. Per tant, s'observà relació directa entre l'augment de nivells de PSA postcirurgia i el grau tumoral ($p = 0,049$).

a.2.5) Relació entre grau tumoral i marge de resecció

S'avaluaren la totalitat de mostres de carcinoma. S'ha evidenciat una tendència a observar-se afectació del marge de resecció amb més freqüència als casos amb un grau de Gleason alt. Així, només 12 de 28 casos (43 %) de baix grau presentaren el marge afectat, mentre que en 16 dels 24 tumors (67 %) d'alt grau el marge fou positiu. Per tant, s'observà una relació directa entre l'augment del grau tumoral i l'afectació del marge de resecció, essent aquesta associació quasi significativa ($p = 0,086$).

a.2.6) Relació entre grau tumoral i invasió perineural

S'avaluaren la totalitat de mostres de carcinoma. La majoria dels casos (20 de 28) (71 %) amb grau de Gleason baix no presenten invasió perineural i la majoria dels casos (15 de 24) (62 %) amb grau de Gleason alt van presentar invasió perineural. Per tant, s'observà un augment de casos amb un grau tumoral més alt en relació amb la presència d'invasió perineural ($p = 0,014$).

a.2.7) Relació entre estadi tumoral i metàstasis ganglionars

S'avaluaren un total de 36 casos. Els casos que presentaren metàstasis ganglionars (5) pertanyeren a un estadi tumoral pT3. Dels casos sense metàstasi, 21 (68 %) pertanyeren a un estadi pT2 i els 10 restants (32 %) es classificaren amb un estadi pT3. Per tant, s'observà una relació directa entre estadi tumoral més avançat amb presència de metàstasis ganglionars ($p = 0,008$).

a.2.8) Relació entre estadi tumoral i PSA preoperatori

S'avaluaren un total de 46 casos. S'observaren nivells de PSA preoperatori superiors a 20 ng/ml en 2 casos de 27 (7 %) amb estadi pT2 i en 9 casos de 19 en estadi pT3 (47 %). En canvi, 25 casos (93 %) amb nivells inferiors a 20 ng/ml foren d'estadi pT2, per 10 casos en estadi pT3 (53 %). Per tant, s'observà una relació directa entre els nivells de PSA i estadis més alts ($p = 0,004$).

a.2.9) Relació entre estadi tumoral i recidiva dels nivells de PSA

S'avaluaren un total de 40 mostres. S'observà l'aparició de recidiva dels nivells alts de PSA en només 7 casos en estadi pT2 (41 %) per 10 casos en estadi pT3 (59 %). En canvi, 16 casos sense recidiva dels nivells de PSA foren d'estadi pT2 (70 %) per només 7 (30 %) en estadi pT3. Per tant, s'observa una relació directa entre l'aparició de recidiva per augment dels nivells de PSA postcirurgia i estadis tumorals més alts, essent aquesta relació quasi signficativa ($p = 0,073$).

a.2.10) Relació entre estadi tumoral i invasió perineural

S'avaluaren la totalitat de les mostres de carcinoma. La major part dels casos (23 de 33) (70 %) amb un estadi pT2 no presentaren invasió perineural. En canvi, la major part dels casos (13 de 19) (68 %) amb un estadi

pT3 presentaren invasió perineural. Per tant, s'ha observat un augment de casos amb un estadi tumoral més avançat en relació amb la presència d'invasió perineural ($p = 0,008$).

a.2.11) Relació entre metàstasis ganglionars i PSA preoperatori

S'avaluaren un total de 35 casos. Quatre casos (80 %) dels 5 que presentaren metàstasis ganglionars van tenir nivells de PSA superiors a 20 ng/ml. Dels casos sense metàstasis ganglionars, 6 (20 %) de 30 presentaren nivells de PSA superiors a 20 i en 24 casos (80 %) els nivells foren inferiors a 20 ng/ml. Per tant, s'ha observat una relació directa entre aparició de metàstasis ganglionars i nivells de PSA superiors a 20 ng/ml, essent aquesta associació significativa ($p = 0,017$).

a.2.12) Relació entre metàstasis ganglionars i recidiva dels nivells de PSA postcirurgia

S'avaluaren un total de 31 casos. Tots els casos amb metàstasis ganglionars presentaren recidiva amb augment dels seus nivells de PSA postcirurgia. En canvi, dels casos sense metàstasi ganglionar, només s'observà recidiva en 10 casos (38 %), mentre que els altres 16 (62 %) no en presentaren. Per tant, s'observa una relació directa entre l'aparició de metàstasis ganglionars i la recidiva dels nivells de PSA postcirurgia ($p = 0,018$).

a.2.13) Relació entre metàstasis ganglionars i edat

S'avaluaren un total de 36 casos. La totalitat dels casos amb metàstasis ganglionars s'observaren en malalts amb 65 anys o menys. En el grup de malalts sense metàstasis ganglionars, només en 15 casos (48 %) tingueren fins a 65 anys. Els altres 16 (52 %) van tenir més de 65 anys d'edat. Per tant, s'observa una relació inversa entre l'aparició de metàstasis i l'edat, essent aquesta associació quasi significativa ($p = 0,053$).

a.2.14) Relació entre metàstasis ganglionars i marge de resecció

S'avaluaren un total de 36 casos. La totalitat de casos amb metàstasis ganglionars s'observaren en casos amb marge de resecció afectat. En canvi, en els casos sense metàstasis ganglionars, 16 (52 %) presentaren un marge negatiu i 15 el presentaren positiu (48 %). Per tant, s'observa una relació directa entre aparició de metàstasis ganglionars i marge de resecció positiu, essent aquesta associació quasi significativa ($p = 0,053$).

a.2.15) Relació entre metàstasis ganglionars i invasió de vesícules seminals

S'avaluaren 15 mostres d'estadi tumoral pT3. En 4 casos (80 %) corresponents a presència de metàstasis ganglionars, s'observà invasió de les vesícules seminals. El cas restant no mostrà signes d'invasió de les vesícules seminals. Pel que fa als casos amb ganglis limfàtics no afectats, s'observà invasió de vesícules seminals en només 2 casos (20 %), mentre que els 8 restants (80 %) no la presentaren. Per tant, s'observa una relació directa entre la presència de metàstasis ganglionars i la invasió de vesícules seminals, essent aquesta associació quasi significativa ($p = 0,089$).

a.2.16) Relació entre PSA preoperatori i recidiva del PSA

S'avaluaren un total de 40 mostres. Vuit casos (73 %) dels 11 amb nivells de PSA prequirúrgics superiors a 20 ng/ml presentaren posteriorment recidiva del PSA postquirúrgic, per 3 casos (27 %) on aquesta recidiva no es donà. Pel que fa a les mostres amb nivells de PSA prequirúrgics inferiors a 20 ng/ml, s'observà recidiva del PSA en 9 casos (31 %), per 20 casos (69 %) que no la presentaren. Per tant, s'observa una relació directa entre un augment dels nivells del PSA prequirúrgics i la posterior aparició de recidiva postquirúrgica de l'augment de nivells de PSA ($p = 0,030$).

a.2.17) Relació entre PSA preoperatori i moment de la recidiva del PSA

S'avaluaren les 17 mostres que presentaren recidiva, amb un augment del PSA postquirúrgic. S'evidenciaren set casos (88 %) de 8 recidivats abans dels 6 mesos postcirurgia quan els nivells de PSA prequirúrgic foren superiors a 20 ng/ml, per només 2 casos (22 %) de 9 recidivats abans dels 6 mesos postcirurgia quan els nivells de PSA prequirúrgic estigueren per sota de 20 ng/ml. Per tant, s'observà una relació inversa entre els nivells de PSA prequirúrgics i el moment d'aparició de la recidiva, apareixent aquesta més precoçment quan els nivells de PSA prequirúrgic ja eren elevats ($p=0,015$).

a.2.18) Relació entre PSA preoperatori i marge de resecció

S'avaluaren un total de 46 mostres. Deu casos (91 %) dels 11 amb nivells de PSA prequirúrgics superiors a 20 ng/ml tingueren el marge de resecció positiu, per només un cas (9 %) amb marge negatiu. En el grup de mostres amb nivells per sota de 20 ng/ml, el marge estava afectat en 17 (49 %), per 18 casos (51 %) amb el marge lliure. Per tant, s'observà una relació directa entre els nivells de PSA preoperatori i l'afectació del marge de resecció ($p=0,016$).

a.2.19) Relació entre recidiva del PSA i marge de resecció

S'avaluaren un total de 40 mostres. Catorze casos (82 %) amb recidiva del PSA presentaren el marge de resecció positiu, per 3 casos (18 %) que no el presentaren. Pel que fa a les mostres que no presentaren recidiva del PSA, el marge de resecció afectat s'observà en 9 casos (39 %) per 14 casos (61 %) que el tingueren lliure. Per tant, s'observà una relació directa entre la recidiva del PSA i l'afectació del marge de resecció ($p = 0,006$).

a.2.20) Relació entre recidiva del PSA i invasió de vesícules seminals

S'avaluaren un total de 17 mostres corresponents a un estadi pT3. No s'observà invasió de vesícules seminals en cap cas corresponents a les mostres que no van presentar recidiva del PSA. En canvi, quan s'observà l'augment dels nivells de PSA postquirúrgic, només 2 casos (20 %) presentaren les vesícules seminals lliures i, en canvi, 8 casos (80 %) mostraren signes d'invasió. Per tant, s'observa una relació directa entre la recidiva del PSA i la invasió de les vesícules seminals ($p = 0,002$).

a.2.21) Relació entre tractament previ i moment en que apareix la recidiva del PSA

S'avaluaren un total de 17 mostres que presentaren recidiva dels nivells de PSA postquirúrgics. La totalitat dels casos que no presentaren recidiva dels nivells de PSA fins als 6 mesos no van rebre cap tractament previ. En canvi, dels casos amb recidiva del PSA a partir de 6 mesos, la meitat (4 casos) havien rebut tractament previ, mentre els 4 casos restants no en van rebre. Per tant, s'observa una relació directa entre el moment que apareix la recidiva del PSA i l'administració de tractament previ ($p = 0,029$).

a.2.22) Relació entre PSA preoperatori i invasió perineural

S'avaluaren un total de 46 mostres. No s'evidencià una associació significativa entre invasió perineural i PSA preoperatori superior a 20 ng/ml. En canvi, si que s'observaren diferències entre el grup amb PSA preoperatori superior a 10 ng/ml i el grup amb nivells de PSA per sota d'aquest valor. Així, quinze casos (62 %) amb nivells de PSA prequirúrgics superiors a 10 ng/ml presentaren posteriorment invasió perineural, per 9 casos (38 %) on no s'observà aquest fet. Pel que fa a les mostres amb nivells de PSA prequirúrgics inferiors a 10 ng/ml, s'observà invasió perineural en només 7 casos (32 %), per 15 casos (68 %) que no la presentaren. Per tant, s'observa una relació directa

entre un augment dels nivells de PSA prequirúrgics i la presència d'invasió perineural ($p = 0,037$).

	GRAU	ESTADI	METÀST. GANGL.	PSA PRE-OPERAT.	RECIDIVA DEL PSA	MOMENT DE LA RECIDIVA DEL PSA
ESTADI	< 0,001	-----	-----	-----	-----	
METÀST. GANGL.	0,045	0,008	-----	-----	-----	
PSA PRE-OPERATORI	0,024	0,004	0,017	-----	0,030	0,015 (*)
RECIDIVA DEL PSA	0,049	0,073	0,018	-----	-----	
EDAT			0,053 (**)			
MARGE DE RESECCIÓ	0,086		0,053	0,016	0,006	
INVASIÓ PERINEUR.	0,014	0,008				
INVASIÓ DE SEMINALS			0,089		0,002	
TRACT. PREVI						0,029

Taula 21. Resum de l'anàlisi dels diversos paràmetres clínicopatològics entre si, amb les relacions significatives ($<0,05$) i quasi significatives ($<0,10$) obtingudes. NS indica una $p > 0,10$. L'asterisc indica relació inversa entre les variables, amb una més freqüent aparició de recidiva del PSA quan el PSA preoperatori fou elevat (*) i una probable aparició de metàstasi ganglionar en individus més joves (**). Les caselles buides corresponen a associacions no significatives amb una $p \geq 0,10$.

B. ESTUDI DE LA PLOIDIA I LA PROLIFERACIÓ CEL.LULAR

B.1. ANÀLISI DESCRIPTIVA DE LA PLOIDIA I PROLIFERACIÓ CEL.LULAR

L'estudi de la ploidia cel.lular i l'anàlisi de la proliferació tumoral mitjançant la determinació de la fase S es feu en 47 casos amb resultats avaluable en 46 casos (98 %) (el cas restant mostrà un coeficient de variació del 9,3 (valorable ≤ 8), per la qual cosa fou descartat).

Trenta-nou tumors foren diploides (85%). La resta de tumors es dividiren entre els 6 tumors aneuploides (13%) i 1 tumor tetraploide (2%).

Pel que fa a la fase S global es va obtenir uns valor mínim inferior al 0,1 % i un valor màxim de 10,8 %, amb una mitjana del 3,75 % i una mediana de 3,50. Van haver 30 casos ≤ 4 (65 %) i 16 casos > 4 (35 %).

Els tumors aneuploides presentaren una fase S corresponent a la seva població aneuploide amb un valor mínim inferior al 0,1 % i un valor màxim de 6,7, una mitjana de 3,14 i una mediana de 2,90. Van haver 4 casos ≤ 4 (57 %) i 3 casos > 4 (43%).

VARIABLE	CARCINOMA
Ploidia	
Diploide	39 (84,8)
No diploide	7 (15,2)
Fracció de Fase S	3,75 (<0,1-10,80)*
$\leq 3,50$	23 (50,0)
$> 3,50$	23 (50,0)
Fracció de Fase S en tumors aneuploides	3,14 (<0,1-6,70)*
$\leq 3,50$	4 (57,1)
$> 3,50$	3 (42,9)

Taula 22. Resum descriptiu de la ploidia i proliferació en els casos de carcinoma (Nº de pacients i percentatge).

* Mitjana, entre parèntesis valors mínim i màxim.

B.2. ANÀLISI DE LA PLOIDIA I PROLIFERACIÓ CEL·LULAR AMB LA RESTA DE PARÀMETRES CLÍNICO-PATOLÒGICS

L'anàlisi de la relació entre els paràmetres de proliferació cel·lular i els diversos paràmetres clínicopatològics aportà les següents diferències significatives ($p < 0,05$) i quasi significatives ($p < 0,10$):

	EDAT	GRAU	ESTADI	PSA PRE-OPERATORI
PLOIDIA	0,043			0,043
FASE S GLOBAL		0,077	0,070	

Taula 23. Resum de les associacions significatives ($p < 0,05$) i quasi significatives ($p < 0,10$) obtingudes a l'analitzar les variables experimentals amb les variables clínicopatològiques. La relació entre variables fou directa en tots els casos. Les caselles buides corresponen a associacions no significatives amb una $p \geq 0,10$.

A continuació s'expliquen els resultats obtinguts d'una manera més detallada:

b.2.1) Relació entre ploidia i edat

La major part dels tumors aneuploides (6 de 7) (86 %) s'observaren en individus majors de 65 anys. En canvi, en els individus de menys de 65 anys, 23 de 24 tumors (96 %) foren diploides. Per tant, s'observà un augment dels casos aneuploides en el grup de més edat. La diferència entre ambdós grups fou estadísticament significativa ($p = 0,043$), encara que aquest resultat cal analitzar-lo amb precaució donat l'escàs nombre de tumors aneuploides que formen part d'aquesta mostra.

VARIABLE	N	EDAT ≤ 65	EDAT > 65	p
Ploidia				
Diploide	39	23 (59,0)	16 (41,0)	0,043
No diploide	7	1 (14,3)	6 (85,7)	

Taula 24. Associació significativa entre ploidia i edat al comparar les mitjanes de les edats en funció de la ploidia i agrupant en dues categories.

b.2.2) Relació entre ploidia i PSA preoperatori

Al comparar els nivells mitjans de PSA preoperatori a les mostres diploides enfront de les no diploides, no s'observaren diferències significatives. En canvi, quan es va estudiar la variable PSA preoperatori amb dues categories separades per un punt de tall establert als 20 ng/ml si s'observà una associació de nivells alts de PSA amb el grup de tumors no diploides ($p=0,043$) (taula 25).

VARIABLE	N	PSA ≤ 20	PSA > 20	p
Ploidia				
Diploide	35	29 (82,9)	6 (17,1)	0,043
No diploide	7	3 (42,9)	4 (57,1)	

Taula 25. Associació significativa entre ploidia i PSA preoperatori. Agrupació en dues categories.

b.2.3) Relació entre fase S global i grau tumoral

Una bona part dels tumors (15 de 24) (62 %) amb un grau baix de Gleason presentaren una fase S ≤ 3,50. En canvi, la major part dels tumors (14 de 22) (64 %) amb un grau alt de Gleason presentaren una fase S > 3,50. Per tant, s'observà una tendència a augmentar els casos amb una fase S global

més elevada en relació amb els tumors de més alt grau. La diferència, però, no fou estadísticament significativa ($p = 0,077$).

VARIABLE	N	2-6	7-10	p
Fracció de Fase S				
≤ 3,50	23	15 (65,2)	8 (34,8)	0,077
> 3,50	23	9 (39,1)	14 (60,9)	

Taula 26. Associació quasi significativa entre fase S global i grau de Gleason. Agrupació en dues categories.

b.2.4) Relació entre fase S global i estadi tumoral

La major part (17 de 28) (61 %) de tumors en l'estadi pT2 presentaren una fase S global ≤ 3,50. En canvi la major part (12 de 18) (67 %) de tumors en l'estadi pT3 presentaren una fase S global > 3,50. Tot i aquesta tendència a augmentar la fase S global amb l'estadi tumoral, les diferències entre ambdós grups no foren significatives ($p = 0,070$).

VARIABLE	N	pT2	pT3	p
Fracció de Fase S				
≤ 3,50	20	17 (73,9)	6 (26,1)	0,070
> 3,50	22	11 (47,8)	12 (52,2)	

Taula 27. Associació quasi significativa entre fase S global i estadi tumoral. Agrupació en dues categories.

C. ESTUDIS EXPERIMENTALS IMMUNOHISTOQUÍMICS

Els estudis experimentals immunohistoquímics que tot seguit s'expressen corresponen als resultats de l'expressió dels gens TP53, bcl-2, p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1}, catepsina B i catepsina S. Un resum de les correlacions

significatives entre aquests marcadors i els paràmetres clínic-patològics s'observa a la taula 52 i un resum de les correlacions significatives entre els diversos marcadors entre sí s'observa a la taula 53.

C.1. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE p53, Bcl-2 i p21^{Waf1/Kip1}

c.1.1) Descripció de l'expressió de p53

L'expressió de p53 en el teixit prostàtic **normal** peritumoral es va poder estudiar en 46 mostres. Les cèl.lules luminals no mostraren en cap cas positivitat per a p53. En canvi, es van detectar focals cèl.lules basals (<1%) amb positivitat per a p53 (Figura 5). La intensitat de la tinció va ser generalment dèbil.

En 24 casos es va poder estudiar aquesta expressió a la **PIN** d'alt grau. S'evidencià expressió de p53 en escasses cèl.lules luminals (<1%) en 14 casos (58 %) i a les cèl.lules basals, la positivitat es detectà rarament (Figura 6). La intensitat de la tinció va ser generalment dèbil, encara que en alguns casos s'aprecià una intensitat destacable.

En les mostres amb **carcinoma** es va detectar positivitat en 28 dels 46 casos examinats (61 %). En aquests casos, la positivitat es detectà en menys del 1% de cèl.lules en 19 casos (41 %), entre el 1 i el 10% de les cèl.lules en 6 casos (13%) i en 3 casos en més del 10% de les cèl.lules. Destacà un d'aquests darrers casos, el qual va evidenciar positivitat en pràcticament la totalitat de les cèl.lules (Figures 9 i 10). Tot i l'escàs nombre de cèl.lules positives a la major part dels casos, es va observar una tendència a formar agregats (utilitzant un terme anglòfon, "clusters") amb zones que presentaren una elevada proporció de cèl.lules positives alternant amb zones totalment negatives, dins d'una mateixa tumoració (Figures 7 i 8). L'augment del percentatge de cèl.lules positives per a p53 no fou significatiu quan es comparà la PIN amb el carcinoma. La intensitat de la tinció també fou força

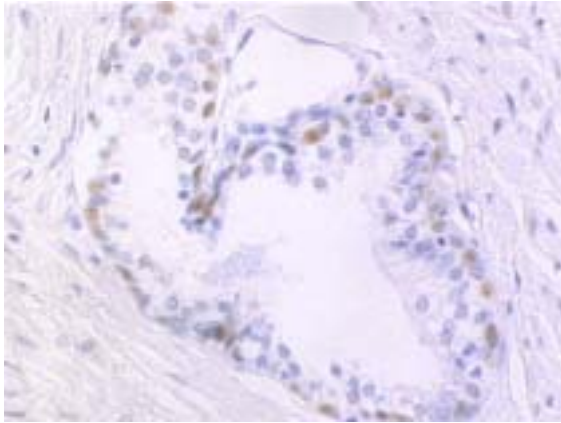


Fig 5. Glàndula prostàtica normal amb positivitat per a p53 en algunes cèl.lules basals.x200

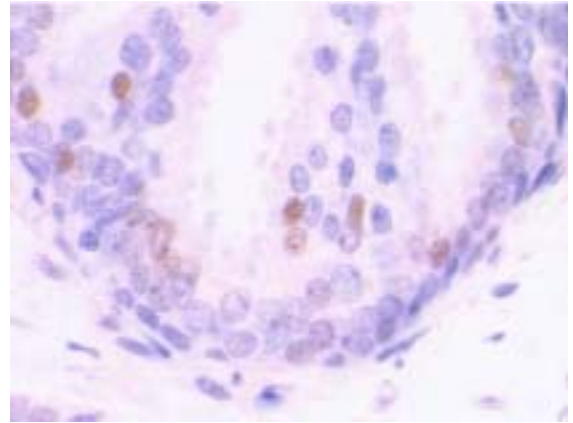


Fig.6. Positivitat per a p53 en escasses cèl.lules luminals en una glàndula amb PIN. x400.

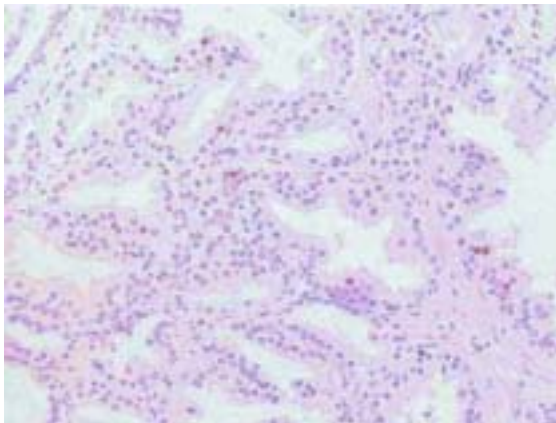


Fig. 7. Carcinoma de pròstata amb positivitat per a p53 en escasses cèl.lules que pertanyen a una zona "hot spot". x100.

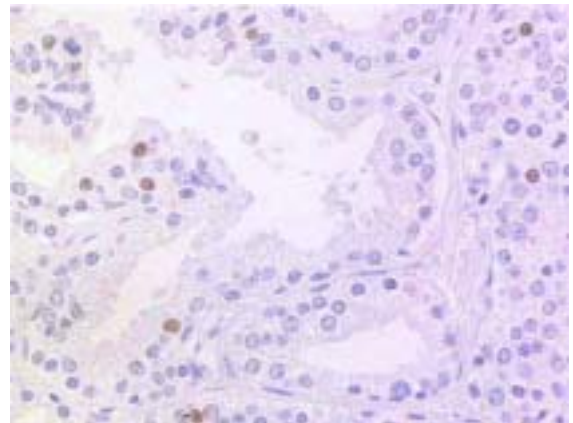


Fig. 8. Imatge a més gran augment de la figura anterior. x200.

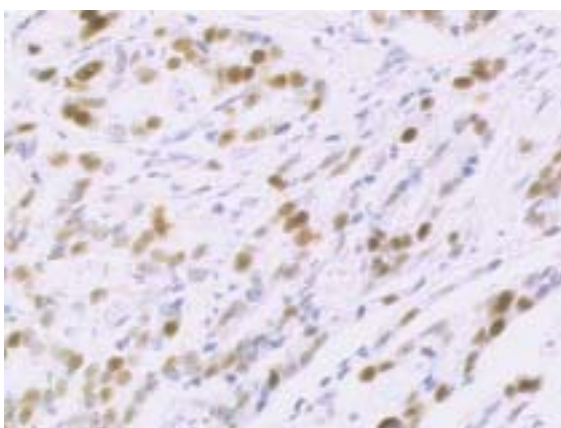


Fig. 9. Carcinoma de pròstata amb positivitat intensa i difusa per a p53 en una zona amb un alt grau de Gleason. x100

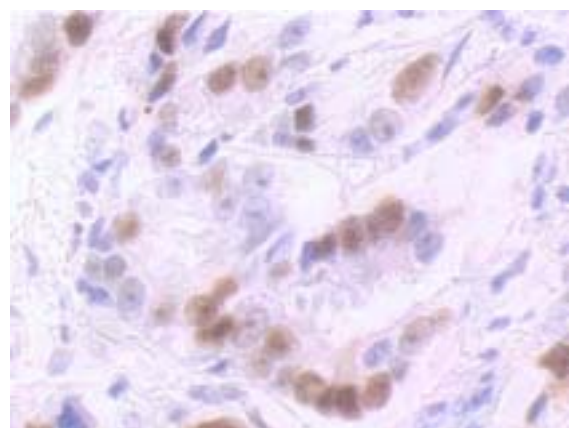


Fig. 10. Imatge ampliada de l'anterior figura,, on s'evidencia una alternança de cèl.lulas intensament positives amb cèl.lules totalment negatives per a p53. x200.

variable, observant-se cèl.lules intensament positives al costat de cèl.lules amb una tinció dèbilment positiva o, fins i tot, negativa (Figura 10).

En general, els casos amb un percentatge més elevat de cèl.lules positives van mostrar també una tendència a presentar una més gran intensitat de tinció per a p53.

A continuació es resumeixen els resultats de l'expressió de p53 en les mostres de PIN d'alt grau i carcinoma, segons els intervals amb els percentatges de cèl.lules positives:

p53	PIN	CARCINOMA
negatiu	10 (41,7)	18 (39,1)
< 1 %	14 (58,3)	19 (41,3)
1 - 10 %	0 (0)	6 (13,0)
> 10 %	0 (0)	3 (6,6)

Taula 28. Resum descriptiu de p53 en mostres de PIN d'alt grau i carcinoma.

c.1.2) Expressió de p53 i paràmetres clínicopatològics

Un resum dels resultats corresponents a l'anàlisi de l'expressió de p53 en funció dels diferents paràmetres clínicopatològics es detalla a la taula 29.

(Pàgina següent) Taula 29. Expressió de p53 i paràmetres clínicopatològics. (Casos i, entre parèntesis, freqüència (%)).

VARIABLE	N	p53 (-)	p53 ≤ 1	p53 > 1-10	p53 > 10	p (- vs.+)
Edat (anys) ≤ 65 > 65	22 24	9 (39,2) 9 (37,5)	9 (39,2) 10 (41,7)	2 (8,6) 4 (16,7)	2 (8,6) 1 (4,1)	NS
Grau (Gleason) 2 - 6 7 - 10	22 24	13 (59,1) 5 (20,8)	7 (31,8) 12 (50,0)	2 (9,1) 4 (16,7)	0 (0,0) 3 (12,5)	0,008
Estadi (patològic) pT2 pT3	27 19	15 (55,6) 3 (15,8)	9 (33,3) 10 (52,7)	1 (3,7) 5 (26,3)	2 (7,4) 1 (5,2)	0,013
Marge de resecció Lliure Afectat	19 27	11 (57,8) 7 (25,9)	6 (31,6) 13 (48,1)	1 (5,3) 5 (18,5)	1 (5,3) 2 (7,4)	0,029
Invasió perineural No Sí	24 22	11 (45,9) 7 (31,9)	8 (33,3) 11 (50,0)	3 (12,5) 3 (13,6)	2 (8,3) 1 (4,5)	NS
Invasió de seminals (pT3) No Sí	11 8	1 (9,1) 2 (25,0)	6 (54,5) 4 (50,0)	3 (27,3) 2 (25,0)	1 (9,1) 0 (0,0)	NS
Metàstasis gangl. No Sí	27 5	11 (40,8) 1 (20,0)	12 (44,4) 2 (40,0)	3 (11,1) 1 (20,0)	1 (3,7) 1 (20,0)	NS
PSA preoperatori ≤ 20 > 20	31 11	12 (38,7) 3 (27,3)	13 (41,9) 5 (45,5)	4 (12,9) 2 (18,1)	2 (6,5) 1 (9,1)	NS
Recidiva del PSA No Sí	22 15	10 (45,5) 5 (33,3)	7 (31,8) 7 (46,7)	3 (13,6) 2 (13,3)	2 (9,1) 1 (6,7)	NS
Moment de la recidiva del PSA ≤ 6 mesos > 6 mesos	8 7	1 (12,5) 4 (57,1)	4 (50,0) 3 (42,9)	2 (25,0) 0 (0,0)	1 (12,5) 0 (0,0)	NS
Tractament previ No Sí	33 9	10 (30,3) 5 (55,6)	15 (45,5) 3 (33,3)	6 (18,1) 0 (0,0)	2 (6,1) 1 (11,1)	NS
Ploidia Diploide No diploide	35 7	15 (42,9) 2 (28,6)	15 (42,9) 2 (28,6)	2 (5,7) 3 (42,8)	3 (8,5) 0 (0,0)	NS
Fracció de Fase S ≤ 3,50 > 3,50	20 22	12 (60,0) 5 (22,7)	5 (25,0) 12 (54,5)	1 (5,0) 4 (18,2)	2 (10,0) 1 (4,5)	0,014
Fracció de Fase S aneuploide ≤ 3,50 > 3,50	4 3	1 (25,0) 1 (33,3)	1 (25,0) 1 (33,3)	2 (50,0) 1 (33,3)	0 (0,0) 0 (0,0)	NS

Al considerar com a cas positiu per a p53 la presència de qualsevol tipus d'expressió, els resultats significatius foren els següents:

a) Expressió de p53 i grau tumoral:

L'expressió de p53 fou positiva en 19 dels 24 casos (79 %) amb un grau alt de Gleason, mentre que l'expressió de p53 fou positiva en només 9 de 22 casos (41 %) amb un grau baix de Gleason. Cal destacar que la totalitat dels casos amb una sobreexpressió de p53 > 10% pertanyeren a tumors d'alt grau. Per tant, s'observà un augment de casos amb sobreexpressió al grup d'alt grau tumoral. Aquesta diferència fou significativa ($p = 0,008$).

b) Expressió de p53 i estadi tumoral:

L'expressió de p53 fou positiva en 16 de 19 casos (84 %) amb un estadi pT3. Als casos amb un estadi pT2 només 12 de 27 (44 %) mostraren expressió positiva de p53. Per tant, s'observà un augment de casos amb sobreexpressió de p53 al grup amb un estadi tumoral més avançat. Aquesta diferència fou significativa ($p = 0,013$).

c) Expressió de p53 i marge de resecció:

L'expressió de p53 fou positiva en 20 dels 27 casos (74 %) amb marge quirúrgic afectat i només en 8 de 19 casos (42 %) amb marge lliure. Per tant, s'observà un augment de casos amb sobreexpressió de p53 al grup amb el marge de resecció afectat. Aquesta diferència fou significativa ($p = 0,029$).

d) Expressió de p53 amb ploidia i proliferació cel.lular:

No s'observaren diferències significatives entre la ploidia de l'ADN i l'expressió de p53. Tampoc es trobaren diferències significatives al relacionar les mitjanes de la fase S global en relació a l'expressió de p53. Tot i això, si

dividim la mostra en dues categories ($\leq 3,50$ i $> 3,50$) i analitzem ambdues variables de forma qualitativa, sí que s'observen resultats interessants. Així, l'expressió de p53 fou positiva en 17 dels 22 casos (77 %) amb una fase S $> 3,50$ i només en 12 dels 20 casos (60 %) amb una fase S $\leq 3,50$. Aquesta diferència fou significativa ($p = 0,014$). Com l'anàlisi de variables qualitatives té menys potència estadística que la comparació de mitjanes, les conclusions que s'obtinguin s'han de valorar amb una certa cura.

c.1.3) Descripció de l'expressió de Bcl-2

L'expressió de Bcl-2 es va examinar en 49 mostres de teixit prostàtic **normal** on es va trobar positivitat ocasional en cèl.lules luminals ($<1\%$ de cèl.lules), mentre que sí s'observà positivitat destacable a la majoria de cèl.lules basals, limfòcits i fibres nervioses (Figura 11). Les glàndules atròfiques sovint foren negatives per a Bcl-2 (fig 15); no obstant, esporàdicament s'observà una intensa positivitat, especialment quan aquestes glàndules es trobaven properes a zones tumorals (fig 14). La positivitat fou intensa a glàndules inflamades i conductes prostàtics. En canvi, a les cèl.lules estromals, Bcl-2 fou fonamentalment negatiu amb algunes cèl.lules tenyides de forma ocasional. La intensitat de la tinció fou variable amb zones intensament positives en un alt percentatge de cèl.lules i zones amb expressió dèbil de Bcl-2 en un escàs nombre de cèl.lules. En general, les cèl.lules basals i transicionals es tenyiren intensament, mentre que les cèl.lules luminals i estromals ho feren de forma més dèbil.

En 23 casos es va poder estudiar l'expressió de Bcl-2 a la **PIN** d'alt grau. Contrastant amb l'epiteli normal, es trobà positivitat a les cèl.lules luminals en 15 casos (65 %) (Figura 12). També continuà essent aparent la positivitat a cèl.lules basals, de manera heterogènia, alternant zones intensament positives amb negatives. La intensitat de la tinció fou destacable en alguns casos.



Fig. 11. Glàndula prostàtica normal amb positivitat difusa per a bcl-2 a les cèl.lules basals. x100.

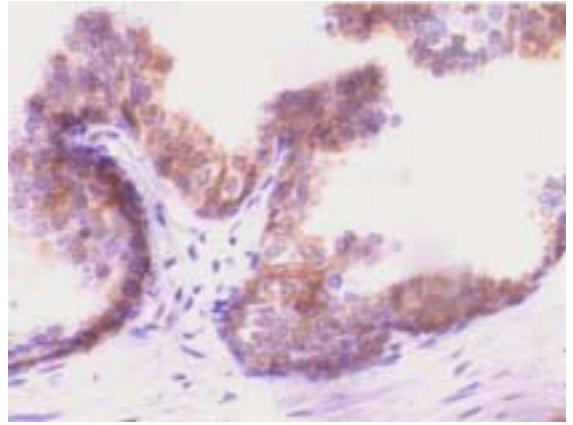


Fig. 12. PIN amb positivitat intensa i difusa per a bcl-2 tant a cèl.lules luminals com a les cèl.lules basals. x200.

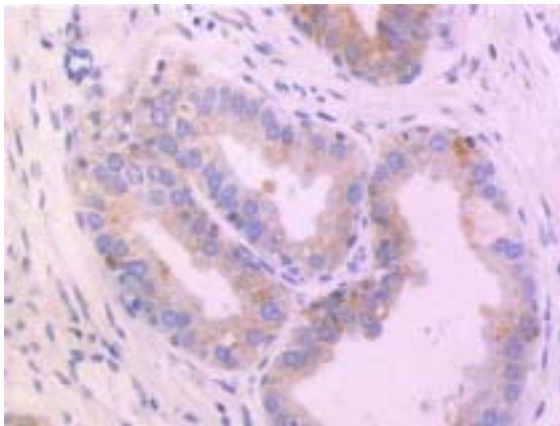


Fig. 13. Carcinoma de pròstata amb positivitat per a bcl-2. x200.



Fig. 14. Glàndules prostàtiques atròfiques (A) intensament positives per a bcl-2, envoltades per carcinoma de pròstata (C) que no expressa bcl-2. x100.

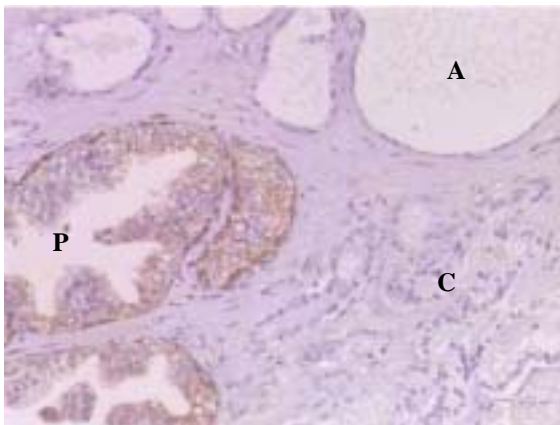


Fig. 15. PIN (P) intensament positiu per a bcl-2, adjacent a zona de carcinoma (C) i glàndules atròfiques (A) que no expressen bcl-2. x100.

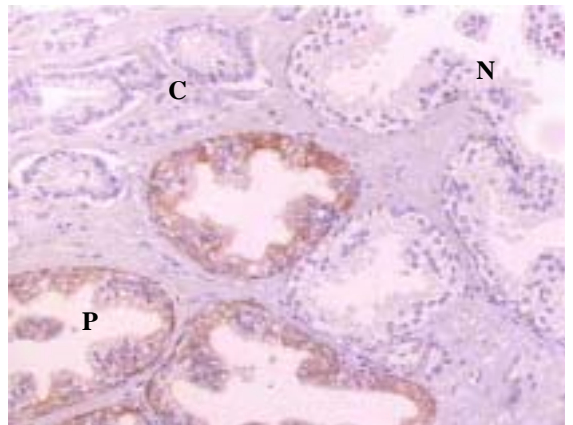


Fig. 16. PIN (P) intensament positiu per a bcl-2, adjacent a zona de carcinoma (C) i glàndules normals (N) que mostren una dèbil positivitat en algunes cèl.lules basals. x200.

A les mostres amb **carcinoma**, l'expressió de Bcl-2 fou evident en 7 dels 49 casos examinats (14 %) (Figura 13). Quan es va observar, es caracteritzà per ser molt heterogènia, amb zones intensament tenyides que es barrejaren amb zones negatives. La disminució del percentatge de cèl.lules positives per a Bcl-2 va ser estadísticament significativa quan es comparà la PIN amb el carcinoma ($p < 0,001$).

A continuació es resumeixen els resultats obtinguts en relació a l'expressió de Bcl-2 al carcinoma i PIN d'alt grau:

Bcl-2	PIN	Carcinoma
negatiu	8 (34,8)	42 (85,7)
positiu	15 (65,2)	7 (14,3)

Taula 30. Resum descriptiu de Bcl-2 en mostres de PIN i carcinoma.

c.1.4) Expressió de Bcl-2 i paràmetres clínicopatològics

S'observaren associacions significatives entre Bcl-2 i els següents paràmetres clínicopatològics (Taula 31):

(Pàgina següent). Taula 31. Expressió de Bcl-2 i paràmetres clínicopatològics.

VARIABLE	N	Bcl-2 (-)	Bcl-2 (+)	p
Edat (anys)				
≤ 65	25	23 (92,0)	2 (8,0)	NS
> 65	24	19 (79,2)	5 (20,8)	
Grau (Gleason)				
2 - 6	26	25 (96,2)	1 (3,8)	0,041
7 - 10	13	17 (73,9)	6 (26,1)	
Estadi (patològic)				
pT2	30	27 (90,0)	3 (10,0)	NS
pT3	19	15 (78,9)	4 (21,1)	
Marge de resecció				
Lliure	22	22 (100)	0 (0)	0,012
Afectat	27	20 (74,1)	7 (25,9)	
Invasió perineural				
No	27	24 (88,9)	3 (11,1)	NS
Sí	22	18 (81,8)	4 (18,2)	
Invasió de seminals (pT3)				
No	11	9 (81,8)	2 (18,2)	NS
Sí	8	6 (75,0)	2 (25,0)	
Metàstasis ganglionars				
No	28	24 (85,7)	4 (14,3)	NS
Sí	5	4 (80,0)	1 (20,0)	
PSA preoperatori				
≤ 20	33	30 (90,9)	3 (9,1)	0,054
> 20	11	7 (63,6)	4 (36,4)	
Recidiva del PSA				
No	23	20 (87,5)	3 (12,5)	NS
Sí	15	11 (73,3)	4 (26,7)	
Moment de la recidiva del PSA				
≤ 6 mesos	9	7 (77,8)	2 (22,2)	NS
> 6 mesos	6	4 (66,7)	2 (33,3)	
Tractament previ				
No	35	31 (88,6)	4 (11,4)	NS
Sí	9	6 (66,7)	3 (33,3)	
Ploidia				
Diploide	38	34 (89,5)	4 (10,5)	0,064
No diploide	7	4 (57,1)	3 (42,9)	
Fracció de Fase S				
≤ 3,50	22	19 (86,4)	3 (13,6)	NS
> 3,50	23	19 (82,6)	4 (17,4)	
Fracció de Fase S aneuploide				
≤ 3,50	11	3 (75,0)	1 (25,0)	NS
> 3,50	3	1 (33,3)	2 (66,7)	

a) Expressió de Bcl-2 i grau tumoral:

Als tumors amb un grau de Gleason baix, 25 dels 26 casos (96 %) foren Bcl-2 negatius. En canvi, als casos amb un grau de Gleason alt, només 17 dels 23 casos (74 %) foren Bcl-2 negatius. Per tant, s'observà un augment de la sobreexpressió de Bcl-2 als tumors d'alt grau ($p = 0,041$).

b) Expressió de Bcl-2 i marge de resecció:

Una dada interessant fou que tots els casos amb marge de resecció lliure foren Bcl-2 negatius. En canvi, 7 dels 27 casos (26 %) amb marge de resecció afectat foren Bcl-2 positius. Per tant, sempre que s'evidencià sobreexpressió de Bcl-2, el marge de resecció es va trobar afectat ($p = 0,012$). Aquesta dada tan contundent cal valorar-la amb cura donat l'escàs nombre de casos que van mostrar sobreexpressió de Bcl-2 en aquesta mostra.

c) Expressió de Bcl-2 amb ploidia i proliferació cel.lular:

L'expressió de Bcl-2 relacionada amb la ploidia nuclear mostrà una diferència quasi significativa ($p = 0,064$). Els tumors diploides sobreexpressaren Bcl-2 només en 4 de 38 casos (10 %), mentre que 3 dels 7 tumors aneuploides (43 %) foren Bcl-2 positius. Aquesta dada cal valorar-la amb precaució donat l'escàs nombre de tumors aneuploides que contenia aquesta mostra.

c.1.5) Descripció de l'expressió de p21^{Waf1/Cip1}

L'expressió de p21^{Waf1/Cip1} es va poder examinar en 49 mostres de teixit prostàtic **normal**. S'evidencià positivitat a cèl.lules luminals i basals, tot i que la proporció de cèl.lules luminals tenyides fou superior (Figura 17). La positivitat a les cèl.lules basals fou més apreciable a les glàndules atrofiques (Figura 18). La positivitat fou difusa i intensa a la metaplasia transicional. A les glàndules inflamades no s'apreciaren diferències destacables respecte a les glàndules no inflamades. També s'evidencià positivitat focal en algunes cèl.lules estromals. En 10 casos (20%), l'expressió de p21^{Waf1/Cip1} fou totalment

absent. En la resta de casos, l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ fou força variable. Per intervals, 11 casos (22%) mostraren positivitat en menys del 1% de cèl.lules, 16 casos (33%) entre el 1 i el 5% de les cèl.lules, 9 casos (18%) entre un 5 i 10% de les cèl.lules i, finalment, 3 casos (6%) amb positivitat en més del 10% de casos. La tinció fou intensa a la majoria de casos, quan s'observà.

Pel que fa a la **PIN** d'alt grau, fou possible examinar la seva expressió en 36 casos. No es va detectar cap tipus d'expressió en 20 casos (56%). En canvi, a la resta de casos, s'evidencià positivitat en cèl.lules luminals amb negativitat de les cèl.lules basals (Figura 19). Per intervals, 8 casos (22%) mostraren positivitat fins a un 1% de les cèl.lules, 4 casos (11%) entre el 1 i el 5% de les cèl.lules, 2 casos (6%) entre un 5 i un 10% de les cèl.lules i, finalment, 2 casos (6%) amb positivitat en més del 10% de cèl.lules.

A les mostres amb **carcinoma**, l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ es va examinar en 52 casos, en els quals no s'evidencià positivitat alguna en 7 casos (14%). En canvi, altres 7 ocasions (14%) mostraren positivitat en menys del 1% de cèl.lules, 16 casos (30%) entre el 1 i el 5% de les cèl.lules, 10 casos (19%) entre un 5 i un 10% de les cèl.lules i, finalment, en 12 casos (23%) la positivitat s'observà en més del 10% de cèl.lules. Generalment, la tinció fou intensa quan s'observà. En tumors amb morfologia cel.lular diversa, l'observació d'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ fou més freqüent i intensa a les cèl.lules neoplàsiques de nuclis grossos i bigarrats, amb citoplasmes amplis (Figures 21 i 22) i, rarament, en tumors d'alt grau la positivitat adoptà un patró perifèric als nius tumorals (Figura 20). La intensitat de la tinció fou variable, en alguns casos en menor grau que a les cèl.lules normals i la PIN.

No s'han observat variacions significatives entre l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ al teixit normal respecte a la PIN i el carcinoma; malgrat observar-se una tendència a augmentar l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ a les cèl.lules luminals des del teixit normal fins al tumoral, amb un lleuger retrocés a la fase de PIN. En canvi, sí que s'evidencià una augment significatiu de l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ durant la progressió des de PIN a carcinoma ($p < 0,001$).

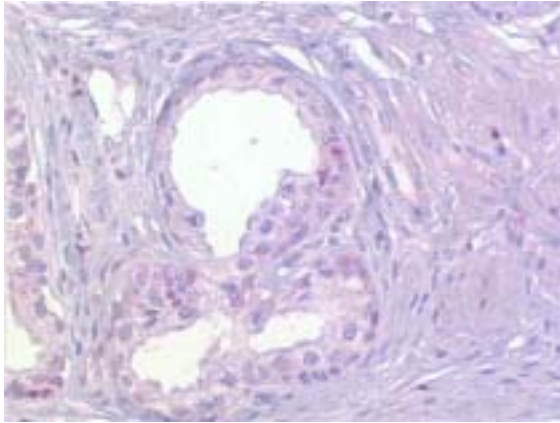


Fig. 17. Glàndula prostàtica normal amb una positivitat dèbil per a p21 a escasses cèl.lules luminals. x200.

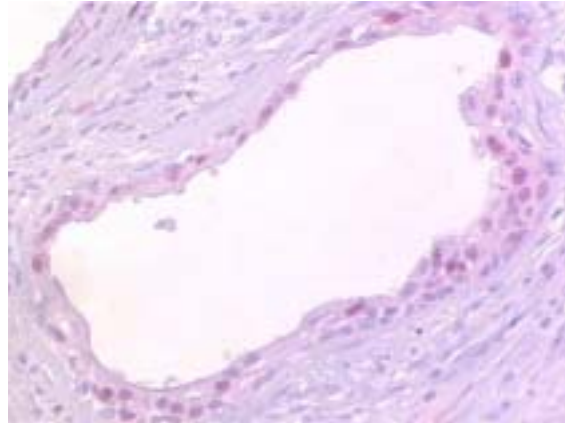


Fig. 18. Glàndula atròfica amb intensa positivitat per a p21. x200.

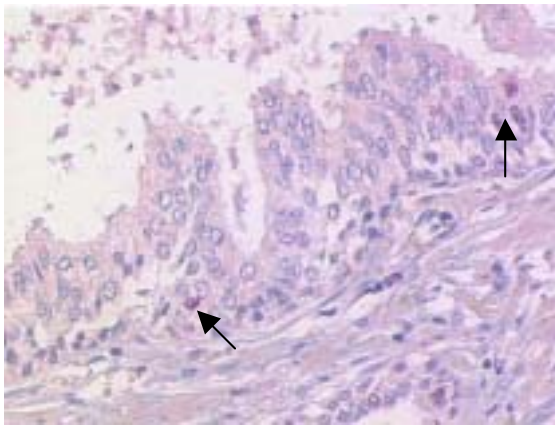


Fig. 19. PIN predominantment negatiu per a p21, a excepció d'aïllades cèl.lules luminals (fletxes). x200.

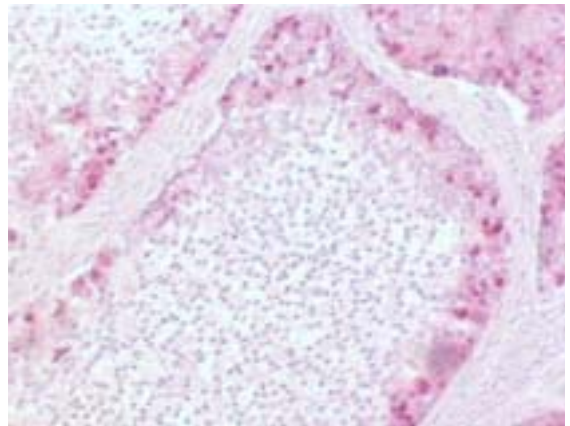


Fig. 20. Carcinoma de pròstata d'alt grau amb positivitat intensa per a p21 a la part perifèrica dels nius tumorals. x100.

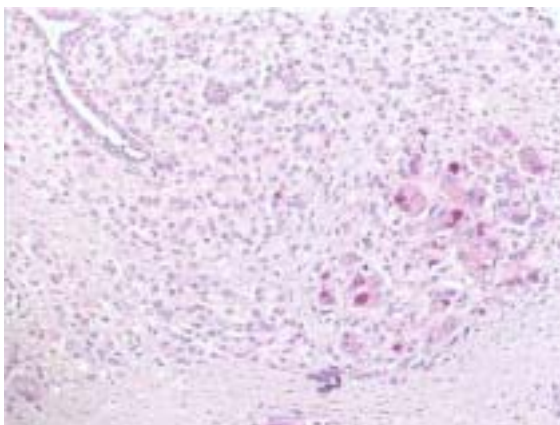


Fig. 21. Carcinoma de pròstata predominantment negatiu per a p21, a excepció d'una zona intensament positiva composta per cèl.lules de mida més gran. x100.

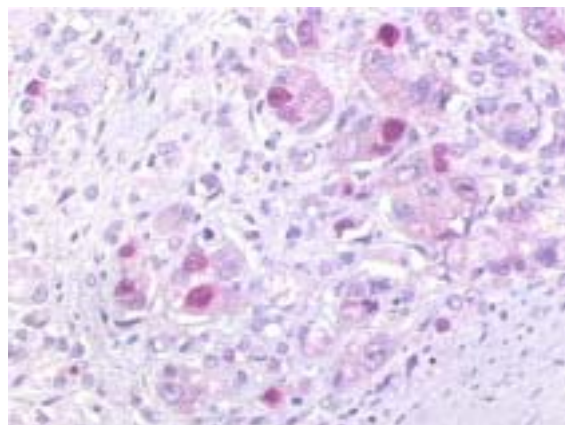


Fig. 22. Imatge a més gran augment corresponent a la figura anterior, de la zona intensament positiva per a p21. x200.

A continuació es resumeixen els resultats obtinguts en relació a l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ al carcinoma, PIN i teixit prostàtic normal:

DESCRIPTIU	NORMAL	PIN	CARCINOMA
nombre de casos	49	36	52
mitjana	3,34	2,21	7,23
mediana	1,50	0,00	4,00
desviació típica	4,01	6,38	8,94
valor màxim	17	33,50	34,50
valor mínim	0	0	0
<u>% de positivitat</u>			
negatiu	10 (20,4)	20 (55,6)	7 (13,5)
< 1 %	11 (22,5)	8 (22,2)	7 (13,5)
1 - < 5 %	16 (32,6)	4 (11,2)	16 (30,8)
5 - 10 %	9 (18,4)	2 (5,6)	10 (19,2)
> 10 %	3 (6,1)	2 (5,6)	12 (23,0)

Taula 32. Resum descriptiu de $p21^{Waf1/Cip1}$ en mostres de teixit normal, PIN i carcinoma. Freqüència i percentatge de positivitat de cada categoria a les mostres de teixit prostàtic normal, PIN i carcinoma.

c.1.6) Expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ i paràmetres clínicopatològics

- TEIXIT NORMAL i PIN:

No s'observà cap associació entre l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ al teixit normal i a la PIN d'alt grau en relació amb les variables clínicopatològiques

- CARCINOMA:

S'observà una associació significativa o quasi significativa entre $p21^{Waf1/Cip1}$ i els següents paràmetres clínicopatològics:

a) Expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ i grau tumoral:

S'avaluaren la totalitat de mostres de carcinoma. S'evidencià una mitjana dels nivells de $p21^{Waf1/Cip1}$ més elevada en el grup de mostres d'alt grau respecte als de baix grau, essent aquesta associació quasi significativa ($p=0,100$).

b) Expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ i marge de resecció:

S'estudiaren la totalitat de mostres de carcinoma. S'evidencià una mitjana dels nivells de $p21^{Waf1/Cip1}$ més elevada al grup de malalts amb marge afectat respecte als que presentaren el marge lliure, essent l'associació quasi significativa ($p=0,068$). En 15 casos de 28 (54 %) corresponents a nivells de $p21^{Waf1/Cip1} \geq 5$ s'aprecià afectació del marge de resecció. En canvi, al grup amb nivells de $p21^{Waf1/Cip1} < 5$ només s'observà afectació del marge de resecció en 7 de 24 casos (29 %). Per tant, s'observà una relació directa entre l'afectació del marge de resecció i nivells d'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$, essent aquesta relació quasi significativa ($p = 0,076$).

c) Expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ i PSA preoperatori:

S'avaluà un total de 46 mostres. En 13 casos de 24 (54 %) corresponents a nivells de $p21^{Waf1/Cip1} \geq 5$ s'observà uns nivells de PSA preoperatori > 10 . En canvi, en el grup amb nivells de $p21^{Waf1/Cip1} < 5$ només s'observaren nivells de PSA preoperatori > 10 en 6 de 22 casos (27 %). Per tant, s'observà una relació directa entre l'augment dels nivells de PSA preoperatori amb l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$, essent aquesta relació quasi significativa ($p = 0,064$).

d) Expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ i recidiva del PSA:

S'avaluà un total de 40 mostres. En 9 casos de 17 (53 %) corresponents a nivells de $p21^{Waf1/Cip1} \geq 5$ s'observà recidiva dels nivells de

PSA. En canvi, en el grup amb nivells de $p21^{Waf1/Cip1} < 5$ només s'observà recidiva en 6 de 23 casos (26 %). Per tant, s'observà una relació directa entre l'aparició de recidiva del PSA amb l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$, essent aquesta relació quasi significativa ($p=0,083$).

e) Expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ i tractament previ:

S'avaluà un total de 47 mostres. S'observà un marcat increment a l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ quan s'administrà tractament previ ($p=0,005$). Tanmateix, aquesta relació fou només quasi significativa ($p=0,066$) quan s'estudià aquesta relació mitjançant una taula de contingència 2x2, establint dues categories amb un punt de tall del 5% de cèl.lules que expresaven $p21^{Waf1/Cip1}$. En aquest cas, $p21^{Waf1/Cip1}$ s'expressà en > 5% de les cèl.lules en 7 casos de 10 (70%) de pacients tractats prèviament enfront de 12 casos de 37 (32%) que no van rebre cap mena de tractament previ.

A continuació es resumeixen els resultats obtinguts corresponents a l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ en funció de les diferents variables clínico-patològiques:

(Pàgina següent). Taula 33. Expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ al teixit tumoral i paràmetres clínico-patològics. Relació de l'expressió de $p21$ al teixit tumoral amb ploidia i proliferació cel.lular

VARIABLE	N	MITJANA (p21^{Waf1/Cip1})	ERROR ESTÀNDAR	p (U Mann-Whitney)	p (Fisher. Tall: 5%)
Edat (anys)					
≤ 65	26	6,62	1,52	NS	NS
> 65	26	7,85	1,98		
Grau (Gleason)					
2 - 6	28	5,34	1,56	0,100	NS
7 - 10	24	9,44	1,91		
Estadi (patològic)					
pT2	33	5,97	1,39	NS	NS
pT3	19	9,42	2,35		
Marge de resecció					
Lliure	24	4,79	1,17	0,068	0,076
Afectat	28	9,32	2,01		
Invasió perineural					
No	29	6,36	1,71	NS	NS
Si	23	8,32	1,81		
Invasió de seminals (pT3)					
No	11	9,68	3,43	NS	NS
Si	8	9,06	3,26		
Metàstasis ganglionars					
No	31	7,42	1,67	NS	NS
Si	5	4,70	1,87		
PSA preoperatori					
≤ 20	35	7,17	1,62	NS	NS
> 20	11	9,45	2,71		
Recidiva del PSA					
No	23	6,13	2,01	NS	0,083
Si	17	8,97	2,26		
Moment de la recidiva del PSA					
≤ 6 mesos	9	8,39	3,15	NS	NS
> 6 mesos	8	9,63	3,47		
Tractament previ					
No	37	5,69	1,34	0,005	0,066
Si	10	14,80	3,23		
Ploidia					
Diploide	39	7,15	1,39	NS	NS
No diploide	7	11,36	4,45		
Fracció de fase S					
≤ 3,50	23	8,67	2,07	NS	NS
> 3,50	23	6,91	1,78		
Fracció de fase S aneuploide					
≤ 3,50	4	12,37	7,64	NS	NS
> 3,50	3	10,00	4,51		

En considerar com a cas positiu per a $p21^{Waf1/Cip1}$ l'expressió en igual o més del 5% de les cèl.lules, es tornaren quasi significatives les correlacions amb el marge de resecció, la recidiva del PSA i el tractament previ.

c.1.7) Correlació entre p53, Bcl-2 i $p21^{Waf1/Cip1}$

Aquestos 3 moduladors es troben en vies de regulació del cicle cel.lular i apoptosi molt properes, per la qual cosa es va considerar com a interessant l'anàlisi de possibles coincidències de les seves alteracions.

a) p53 / Bcl-2:

En les mostres tumorals, les alteracions en l'expressió d'aquestos marcadors semblen ser independents, donat que, per exemple, van haver casos en que coincidiren positivitats de p53 i Bcl-2 i altres en els quals no es trobà cap coincidència.

VARIABLE BCL-2	N	p53 = 0	p53 > 0	p
Bcl-2 = 0	38	16 (35,6)	22 (48,9)	NS
> 0	7	2 (4,4)	5 (11,1)	

Taula 34. Relació entre l'expressió de p53 i Bcl-2 en el teixit tumoral.

b) p53 / $p21^{Waf1/Cip1}$.

En les mostres tumorals, tampoc es va evidenciar cap associació significativa entre p53 i $p21^{Waf1/Cip1}$. De tota manera fou d'especial interès el fet que vam veure respecte a com la possible alteració de p53 (p53 (+)) coincidia en 12 casos amb l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$, la qual està suposadament induïda per l'anterior i, per tant, aquest darrer modulador no hauria d'expressar-se en els casos p53(+).

VARIABLE p53	N	MITJANA ($p21^{Waf1/Cip1}$)	ERROR ESTÀNDAR	p
p53 = 0 > 0	18	5,36	1,52	NS
	28	8,66	1,99	
		$p21^{Waf1/Cip1}$ ≤ 5	$p21^{Waf1/Cip1}$ > 5	
p53 = 0 > 0	18	11 (23,9)	7 (15,2)	NS
	28	16 (34,8)	12 (26,1)	

Taula 35. Absència d'associació significativa entre l'expressió de p53 i $p21^{Waf1/Cip1}$. Comparació de mitjanes d'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ en relació a qualsevol tipus de positivitat de p53 i agrupant en dues categories.

c) $p21^{Waf1/Cip1}$ / Bcl-2:

- PIN:

No es va evidenciar cap associació significativa pel que fa a l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ i Bcl-2 a les mostres de PIN.

- Carcinoma:

Només s'han obtingut dades significatives al relacionar l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ i de Bcl-2 tant al comparar les mitjanes de l'expressió en carcinomes de $p21^{Waf1/Cip1}$ respecte a Bcl-2 ($p = 0,020$), com avaluant l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ dividida en dos grups amb un punt de tall del 5 %. Així, els 28 casos (100 %) d'expressió de $p21^{Waf1/Cip1} \leq 5$ foren Bcl-2 negatius. En canvi, només 14 dels 21 casos (67 %) d'expressió de $p21^{Waf1/Cip1} > 5$ foren Bcl-2 negatius. Per tant, s'observà un augment de l'expressió de Bcl-2 en els tumors que expressaven de forma important $p21^{Waf1/Cip1}$. La diferència entre tots dos grups fou estadísticament significativa ($p = 0,001$).

VARIABLE BCL-2	N	MITJANA (p21 ^{Waf1/Cip1})	ERROR ESTÀNDAR	p
Bcl-2 = 0	42	6,02	1,35	0,020
> 0	7	14,43	2,68	
		p21 ^{Waf1/Cip1} < 5	p21 ^{Waf1/Cip1} ≥ 5	
Bcl-2 = 0	38	28 (57,1)	14 (28,6)	0,001
> 0	7	0 (0)	7 (14,3)	

Taula 36. Associació significativa entre l'expressió de Bcl-2 i p21^{Waf1/Cip1} en carcinomes. Comparació de mitjanes d'expressió de p21^{Waf1/Cip1} en relació a qualsevol tipus de positivitat de Bcl-2 i agrupació en dues categories.

Per tal d'eliminar el possible efecte del grau histològic sobre l'associació significativa entre p21^{Waf1/Cip1} i Bcl-2, es va estudiar l'expressió de p21^{Waf1/Cip1} i Bcl-2 només en el grup de casos amb baix grau de Gleason. Vam observar, que aquesta associació significativa es perdia quan es controlava el grau.

C.2. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE P27^{Kip1}

c.2.1) Descripció de l'expressió de p27^{Kip1}

L'epiteli **normal** prostàtic va mostrar, en la major part dels casos, una expressió nuclear variable, encara que difusa i intensa, generalment a més del 60% de les cèl.lules tant a les àrees centrals com a les perifèriques de l'òrgan (Figura 23). Resultats similars es van observar a la metaplàsia transicional, conductes ejaculadors, glàndules atrofiques i inflamades. També s'ha trobat expressió de p27^{Kip1} en algunes cèl.lules estromals a tots els tipus de mostres. Les cèl.lules basals a les glàndules benignes foren menys freqüentment positives que les cèl.lules luminals, i cada glàndula usualment ha presentat menys del 50% de cèl.lules basals positives.

Resultats similars als obtinguts al teixit prostàtic normal, es van observar als nòduls **hiperplàsics** benignes. L'expressió mitjana fou de 71,81 amb un valor màxim de 90 i un de mínim de 60.

D'altra banda, l'expressió de $p27^{Kip1}$ en mostres coincidentals amb **PIN** d'alt grau, va correspondre sempre al grup d'expressors baixos (<50%) i mostrà sovint un percentatge de cèl.lules positives similars al carcinoma, o intermedi entre aquest darrer i el teixit normal en casos amb carcinoma amb baixa expressió (Figura 24).

Una evident regulació disminuïda de l'expressió de $p27^{Kip1}$ s'observà a la major part dels **carcinomes** quan es compara amb l'epiteli prostàtic benigne parellat (Figura 25). Quaranta-set casos (84%) foren considerats expressors baixos de $p27^{Kip1}$, amb un percentatge de cèl.lules positives que va de menys del 1% al 50%. 9 casos (16%) mostraren una immunotinció de $p27^{Kip1}$ a més del 50% de cèl.lules (Figura 26).

Les **metàstasis** del carcinoma de pròstata foren expressores baixes de $p27^{Kip1}$ en 16 casos (84%) de les quals 7 foren absolutament negatives. 6 mostres metastàsiques van tenir el seu primari corresponent analitzat (4 biòpsies per agulla, 2 prostatectomies radicals): 3 casos mostraren una expressió de $p27^{Kip1}$ disminuïda a les metàstasis, 2 casos foren negatius tant al tumor primari com a les metàstasis i un augment de l'expressió s'evidencià al cas restant.

La disminució del percentatge de les cèl.lules $p27^{Kip1}$ positives va ser estadísticament significatiu quan es comparà el teixit normal amb cada tipus de lesió neoplàsica (PIN, carcinoma i metàstasis) ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p < 0,001$, respectivament). També va ser significatiu el descens de casos de PIN, carcinomes primaris i metàstasis amb elevada expressió de $p27^{Kip1}$ quan eren comparats amb teixit normal ($p < 0,001$). Sorprenentment, es va trobar una mitjana d'expressió de $p27^{Kip1}$ a la PIN lleugerament inferior al carcinoma, així com una expressió al carcinoma també lleugerament inferior respecte a la



Fig. 23.. Glàndula prostàtica normal que mostra una intensa positivitat en la major part de les cèl.lules epitelials, predominantment a la capa luminal. Algunes cèl.lules estromals també mostren expressió nuclear de p27. x400.

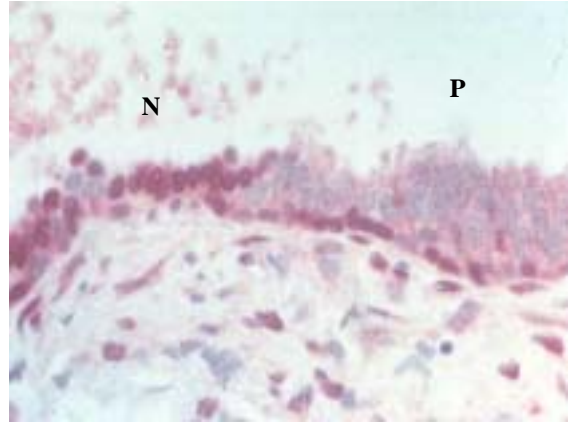


Fig. 24. Transició entre epitelí normal (N) i PIN (P) que mostra una disminució de l'expressió de p27 en a les múltiples capes de l'epitelí pre-invasiu. L'expressió de p27 es reté en algunes cèl.lules basals. x400.

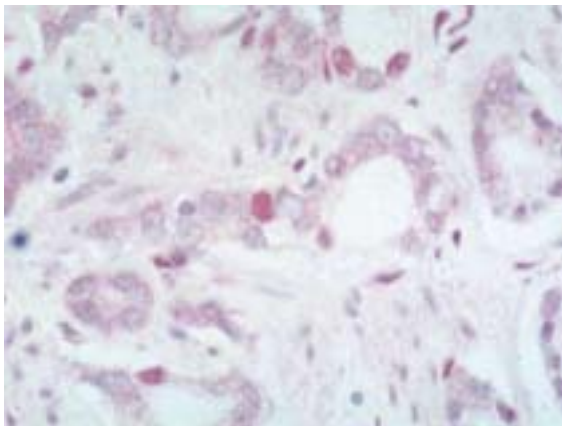


Fig. 25. Glàndules malignes de carcinoma de pròstata que expressen p27 només a uns quants nuclis. x400.

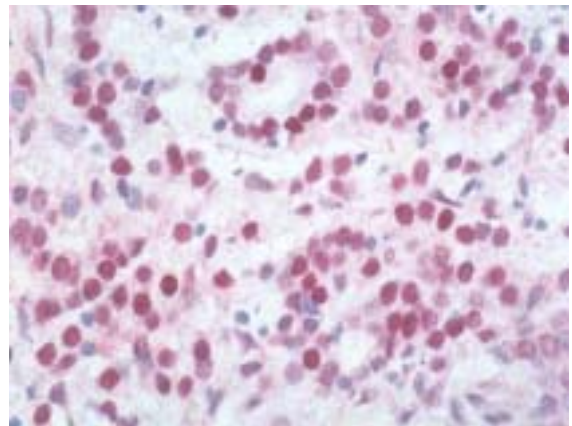


Fig. 26.. Expressió intensa de p27 en glàndules de carcinoma de pròstata.. x400.

metàstasi. Aquest fet podria ser atribuïble a un insuficient nombre de casos dels quals consta la mostra i a la utilització de casos diferents per comparar PIN i carcinoma amb les metàstasis.

No s'han trobat diferències significatives de l'expressió de p27^{Kip1} quan es compararen tumors amb metàstasis utilitzant ambdós punts de tall abans esmentats.

	NORMAL	HIPERPLASIA	PIN	CARCINOMA	METÀSTASI
nombre de casos	50	11	21	52	19
mitjana	63,40	71,82	19,38	25,31	27,64
mediana	70,00	80,00	10,00	20,00	5,00
desviació típica	19,23	11,68	14,02	22,90	35,63
valor màxim	90	90	40	80	90
valor mínim	10	60	0,10	0,10	0
% de positivitat					
≤ 50 %	10 (20,0)	11 (100)	21 (100)	43 (82,7)	13 (68,4)
> 50 %	40 (80,0)	0 (0)	0 (0)	9 (17,3)	6 (31,6)
≤ 30 %	6 (12,0)	11 (100)	18 (85,7)	28 (53,8)	13 (68,4)
> 30 %	44 (88,0)	0 (0)	3 (14,3)	24 (46,2)	6 (31,6)

Taula 37. Resum descriptiu de p27^{Kip1} en mostres de carcinoma, PIN i teixit normal, hiperplàsia, PIN, carcinoma i metàstasi. Freqüència i percentatge de positivitat de cada categoria a les mostres de teixit normal, hiperplàsia, PIN, carcinoma i metàstasis.

c.2.2) Expressió de p27^{Kip1} i paràmetres clínicopatològics

- TEIXIT NORMAL I PIN:

En general no es van evidenciar dades rellevants. Només s'obtingué una associació significativa entre l'expressió de p27^{Kip1} al teixit normal amb l'edat ($p = 0,058$). Així, s'observà una disminució de p27^{Kip1} al teixit normal en funció de l'edat.

No s'observa cap relació entre l'expressió de p27^{Kip1} a la PIN i la resta de variables clínicopatològiques.

VARIABLE	N	MITJANA (p27 ^{Kip1})	ERROR ESTÀNDAR	p
Edat (anys)				
≤ 65	24	68,75	3,20	0,058
> 65	26	58,46	4,14	

Taula 38. Relació de l'expressió de p27^{Kip1} al teixit normal amb l'edat

- CARCINOMA:

S'observà una associació significativa o quasi significativa entre p27^{Kip1} i els següents paràmetres clínico-patològics:

a) Expressió de p27^{Kip1} i grau tumoral:

En comparar les mitjanes de l'expressió de p27^{Kip1} als grups de tumors d'alt amb els de baix grau, s'observà una relació directa, amb un augment dels nivells de p27^{Kip1} amb el grau tumoral ($p = 0,060$). D'altra banda, prenent com a punt de tall el valor de 30%, el grup de tumors amb elevada expressió de p27^{Kip1} mostrà un grau de Gleason significativament elevat (29 %) al comparar amb el grup de tumors amb expressió baixa de p27^{Kip1}, el qual mostrà preferentment un grau de Gleason baix (36% dels casos) ($p = 0,029$).

b) Expressió de p27^{Kip1} i estadi tumoral:

S'avaluaren la totalitat de les mostres. Prenent com a punt de tall el 30%, s'observà un més gran nombre de casos amb expressió alta de p27^{Kip1} respecte als casos expressors baixos en un estadi pT3 (63 %) enfront del pT2 (37 %). Per tant, s'observà una relació directa que fou quasi significativa ($p = 0,062$).

(Pàgina següent). Taula 39. Relació de l'expressió de p27^{Kip1} al teixit tumoral amb la resta de paràmetres experimentals.

VARIABLE	N	MITJANA (p27^{Kip1})	ERROR ESTÀNDAR	p
Edat (anys)				
≤ 65	26	24,73	4,06	NS
> 65	26	25,89	4,96	
Grau (Gleason)				
2 - 6	28	19,80	4,32	0,060
7 - 10	24	31,75	4,43	
Estadi (patològic)				
pT2	33	22,40	4,03	NS
pT3	19	30,37	5,07	
Marge de resecció				
Lliure	24	25,50	4,48	NS
Afectat	28	25,15	4,55	
Invasió perineural				
No	29	18,04	3,28	0,014
Si	23	34,48	5,36	
Invasió de seminals (pT3)				
No	11	31,45	6,14	NS
Si	8	28,88	9,09	
Metàstasis ganglionars				
No	31	27,85	3,96	NS
Si	5	32,00	11,14	
PSA preoperatori				
≤ 20	35	29,20	4,03	NS
> 20	11	23,83	6,29	
Recidiva del PSA				
No	23	29,65	4,90	NS
Si	17	25,42	5,60	
Moment de la recidiva del PSA				
≤ 6 mesos	9	26,79	7,21	NS
> 6 mesos	8	23,88	9,20	
Tractament previ				
No	37	27,65	3,62	NS
Si	10	27,11	8,66	
Ploidia				
Diploide	39	27,26	3,54	NS
No Diploide	7	15,30	8,44	
Fracció de fase S				
≤ 3,50	23	26,79	4,87	NS
> 3,50	23	24,09	4,52	
Fracció de fase S aneuploide				
≤ 3,50	0	-	-	-
> 3,50	4	16,52	16,52	

c) Expressió de p27^{Kip1} i invasió perineural:

Tant prenent com a punt de tall el 30% com el 50%, les diferències entre el grup expressor alt i l'expressor baix de p27^{Kip1} foren quasi significatives (30%: $p = 0,058$; 50%: $p = 0,061$). Els resultats mostren una tendència a no haver invasió perineural al grup d'expressors baixos i sí al grup d'expressors alts.

Al considerar l'expressió de p27^{Kip1} com una variable qualitativa dicotòmica, amb punts de tall fixats en el 50% i 30% de les cèl.lules tenyides, les associacions significatives foren les següents:

VARIABLE	N	p27 ^{Kip1} ≤ 50	p27 ^{Kip1} > 50	p
Invasió perineural				
No	29	27 (93,1)	2 (6,9)	0,061
Sí	23	16 (69,6)	7 (30,4)	

Taula 40. Associacions quasi significatives entre l'expressió de p27^{Kip1} i paràmetres clínic-patològics. Punt de tall al 50%.

VARIABLE	N	p27 ^{Kip1} ≤ 30	p27 ^{Kip1} > 30	p
Grau (Gleason)				
2 - 6	28	19 (67,9)	9 (32,1)	0,029
7 - 10	24	9 (37,5)	15 (62,5)	
Estadi (patològic)				
pT2	33	21 (63,6)	12 (36,4)	0,062
pT3	19	7 (36,8)	12 (63,2)	
Invasió perineural				
No	29	19 (65,5)	10 (34,5)	0,058
Sí	23	9 (39,1)	14 (60,9)	

Taula 41. Associacions significatives i quasi significatives entre l'expressió de p27^{Kip1} i paràmetres clínic-patològics. Punt de tall al 30%.

Per tal d'eliminar el possible efecte del grau histològic i l'estadi tumoral sobre l'associació significativa entre $p27^{Kip1}$ i la invasió perineural, es va estudiar l'expressió de $p27^{Kip1}$ i Bcl-2 només al grup de casos amb baix grau de Gleason i amb un estadi tumoral pT2. Vam observar, que aquesta associació significativa es perdia quan es controlava el grau i l'estadi tumoral.

d) Expressió de $p27^{Kip1}$ amb ploidia i proliferació cel.lular:

No s'observaren en cap cas diferències significatives entre el grup d'expressió elevada i el grup de baixa expressió de $p27^{Kip1}$ en relació a la ploidia i la fase S global.

c.2.3) Relació entre l'expressió de $p27^{Kip1}$ amb p53, Bcl-2 i $p21^{Waf1/Cip1}$

Tal com s'aprecia a la següent taula, no s'evidencia cap relació significativa de $p27^{Kip1}$ amb p53, Bcl-2 i $p21^{Waf1/Cip1}$.

VARIABLE	N	MITJANA ($p27^{Kip1}$)	ERROR ESTÀNDAR	p
p53 = 0 > 0	18 28	24,28 28,86	5,58 4,50	NS
Bcl-2 = 0 > 0	42 7	25,10 31,71	3,46 11,30	NS
$p21^{Waf1/Cip1}$ ≤ 5 >5	30 22	28,94 20,37	4,43 4,34	NS

Taula 42. Relació entre l'expressió de $p27^{Kip1}$ amb p53, Bcl-2 i $p21^{Waf1/Cip1}$ en el carcinoma.

C.3. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE LES CATEPSINES B I S

c.3.1) Descripció de l'expressió de les catepsines B i S

L'epiteli luminal de les glàndules prostàtiques **normals** fou generalment negatiu per la Cat B excepte a les glàndules atròfiques o inflamades (Figures 27 i 29). La positivitat en glàndules normals es limità a una expressió intensa a la capa de cèl.lules basals, tot i què positivitat focal a les cèl.lules luminals s'observà en alguns casos. La positivitat més intensa entre tots els teixits prostàtics s'observà sempre a l'epiteli transicional dels ductes periuretrals prostàtics i a la metaplàsia transicional (Figura 31). També s'observà una intensa positivitat als histiòcits intraglandulars i intersticials.

La Cat S fou bàsicament negativa en l'epiteli prostàtic normal, encara que una dèbil positivitat granular s'observà al pol basal de l'epiteli en algunes glàndules. Cal destacar també que, esporàdicament, cèl.lules luminals mostraren una intensa tinció citoplasmàtica difusa en molts casos (Figura 28). De forma similar a la Cat B, també es trobà positivitat en histiòcits intraglandulars i periglandulars, metaplàsia transicional i a l'epiteli inflammat (Figures 30 i 32), encara que les glàndules atròfiques foren negatives.

Les cèl.lules ganglionars periprostàtiques foren intensament positives per ambdues catepsines. En la major part dels casos, una expressió dèbil d'aquestes proteases s'observà a l'estroma normal de la pròstata.

En les glàndules **hiperplàsiques** també destacà l'expressió intensa de Cat B a la capa de cèl.lules basals, amb focal positivitat en cèl.lules luminals tenyides. La Cat S mostrà una expressió similar a la observada en el teixit normal, amb focals cèl.lules basals tenyides.

Vint dels 23 casos de **PIN** (87%) mostraren expressió de Cat B (Figura 33). Resultats similars s'obteniren amb la Cat S (22 de 26 casos (85%)), essent ambdues expressions concomitants en 18 casos (78%).

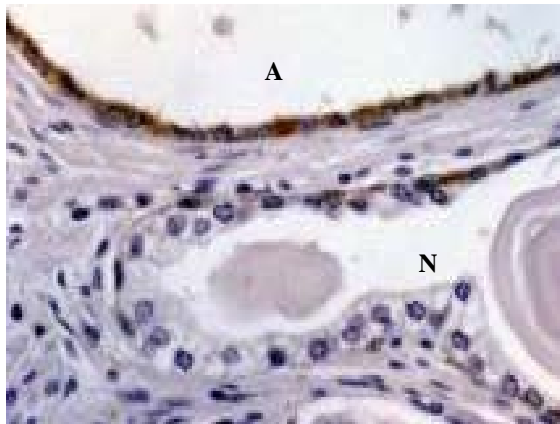


Fig. 27. Glàndula prostàtica normal (N) amb cèl.lules luminals CatB(-) i escasses cèl.lules basals CatB(+). També s'observa una glàndula atròfica (A) intensament positiva. x400.

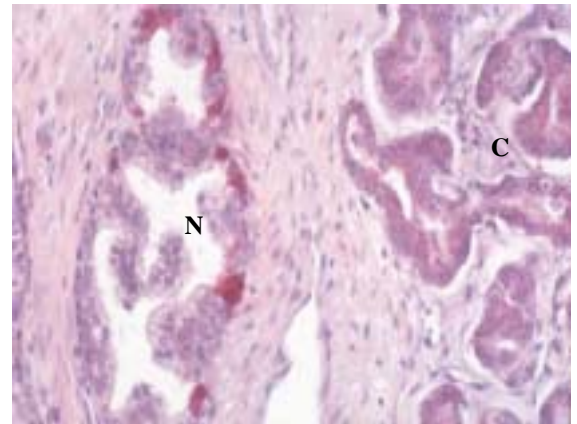


Fig. 28. Glàndula prostàtica normal (N) que mostra un epiteli predominantment CatS(-) amb escasses cèl.lules intensament positives. També s'observa un focus de carcinoma (C) CatS(+). x200.

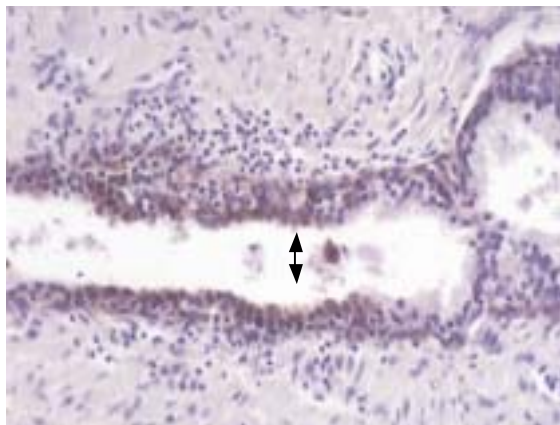


Fig. 29. Glàndula prostàtica normal amb expressió epitelial intensa de CatB a les zones més inflamades (fletxes). x200.

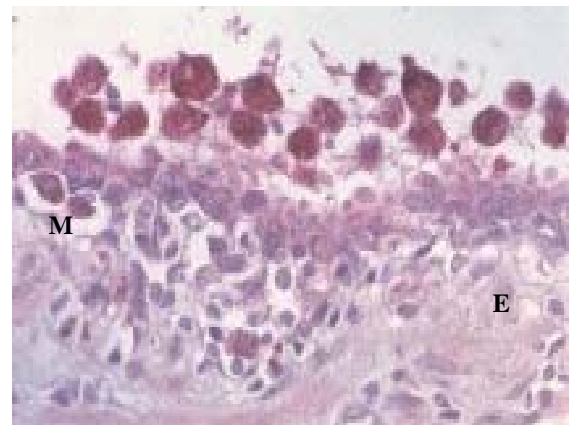


Fig. 30. Glàndula normal inflamada que conté macròfags que expressen CatS. També s'observa expressió de CatS a les cèl.lules epitelials (E) i a macròfags que migren (M). x400.

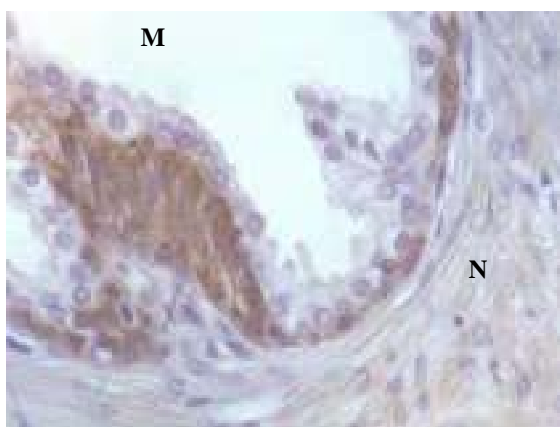


Fig. 31. Intensa expressió de CatB a una zona de metaplàsia transicional (M), i a les cèl.lules basals de l'epiteli normal adjacent (N). x400.

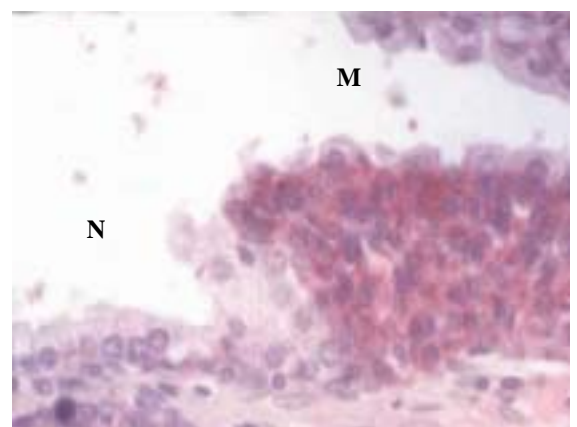


Fig. 32.. Intensa expressió de CatS a una zona de metaplàsia transicional (M), amb epiteli normal adjacent negatiu (N). x400.

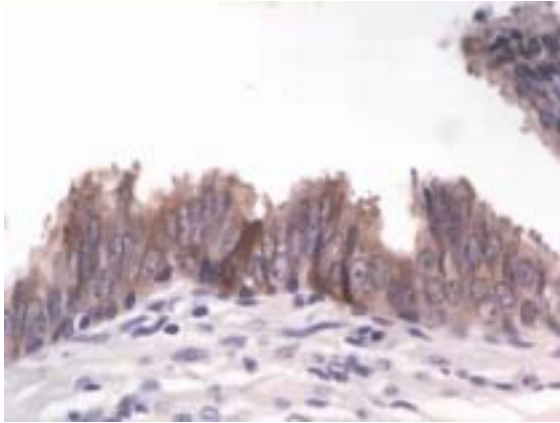


Fig. 33.. PIN d'alt grau amb intensa expressió de CatB. x400.

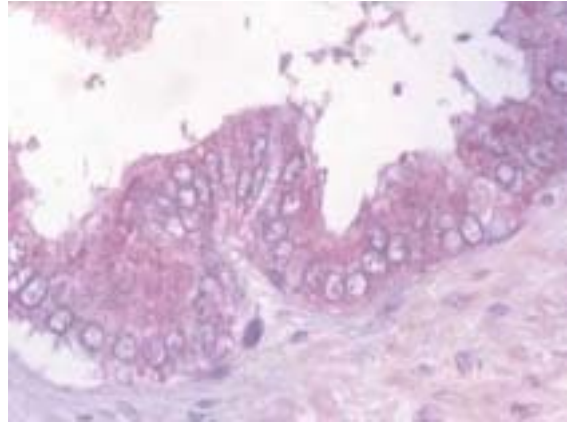


Fig. 34. PIN d'alt grau amb intensa expressió granular de CatS a les cèl.lules luminals. x400

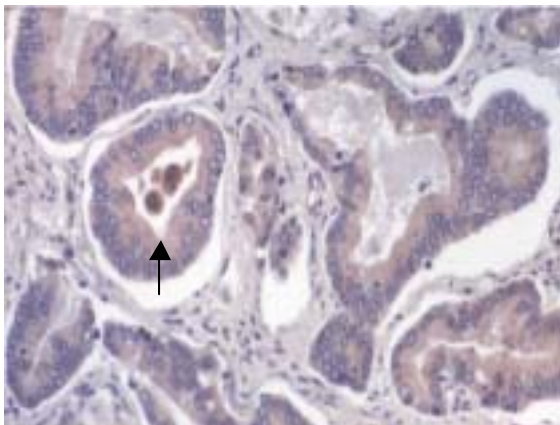


Fig. 35. Carcinoma de pròstata que expressa difusament CatB. S'observen macròfags intraluminals amb expressió intensa de Cat B (fletxa). x200.

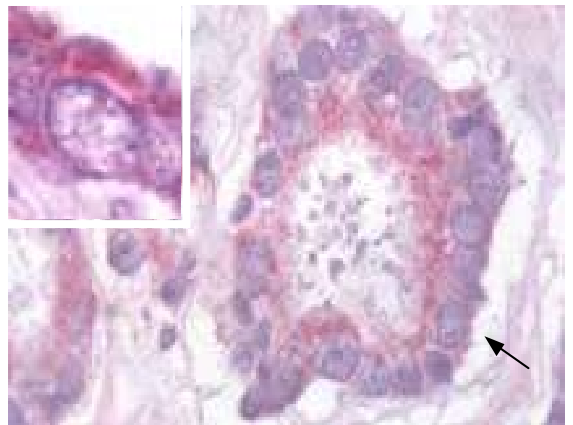


Fig. 36. Expressió granular de CatS al carcinoma de pròstata. La positivitat es més intensa a sobre del nucli (fletxa). x600. A l'aproximació es mostra l'acumulació d'immunopositivitat cap al pol apical. Oli d'immersió. x1000.

L'expressió de Cat S és generalment més granular que la de la Cat B (Figura 34). Les escasses cèl.lules basals de la PIN foren generalment positives per la Cat B, mentre que l'expressió de la Cat S no resultà evident.

L'expressió de la Cat B s'observà en 28 **carcinomes** (74%) (+: 13, ++: 14, +++: 1). La Cat S s'expressà en 32 casos (84%) (+: 17, ++: 12, +++: 3) (Figures 35 i 36). Tant l'expressió citoplasmàtica difusa com la finament granular de la Cat B s'observà als carcinomes, mentre que la Cat S fou bàsicament granular grollera. L'expressió de la Cat S fou, de vegades, més intensa a la part supranuclear de les cèl.lules tumorals (Figura 36, requadre superior esquerre). L'expressió d'aquestes proteases fou heterogènia en cada cas, generalment en algunes àrees de la neoplàsia, i la positivitat d'ambdós enzims s'observà en 24 casos (63%). Els macròfags Cat B positius foren observats freqüentment a les glàndules neoplàsiques (Figura 35). D'altra banda, escassos histiòcits estromals positius s'observaren en focus tumorals en alguns casos. També s'obtingueren resultats similars per a la Cat S.

VARIABLE	PIN	CARCINOMA
Cat B		
negatiu	3 (11,5)	12 (27,3)
< 10 %	21 (80,8)	13 (29,5)
10 - 50 %	2 (7,7)	18 (40,9)
> 50 %	0 (0,0)	1 (2,3)
Cat S		
negatiu	3 (11,5)	7 (17,1)
< 10 %	17 (65,4)	18 (43,9)
10 - 50 %	6 (23,1)	13 (31,7)
> 50 %	0 (0,0)	3 (7,3)

Taula 43. Resum descriptiu de l'expressió de catepsina B i S en mostres de PIN i carcinoma (Nº de pacients i percentatge).

Als casos on s'identificà carcinoma, PIN i teixit normal es va evidenciar un augment significatiu de l'expressió de la Cat B a les mostres de carcinoma respecte a les mostres de PIN ($p=0,013$). En canvi, a les mostres

tenyides de Cat S no s' evidencià cap augment de l'expressió a les mostres de carcinoma respecte al teixit normal i PIN, ni entre la PIN respecte al teixit normal.

VARIABLE Cat B	N	Cat B T= 0	Cat B T > 0	p
Cat B PIN				
= 0	3	3 (11,5)	0 (0)	0,013
> 0	23	4 (15,4)	19 (73,1)	

Taula 44. Augment significatiu de l'expressió de Catepsina B en mostres de carcinoma respecte a la PIN. Agrupació en dues categories.

VARIABLE Cat S	N	Cat S T= 0	Cat S T > 0	p
Cat S PIN				
= 0	3	0 (0)	3 (11,5)	NS
> 0	23	1 (3,8)	22 (84,6)	

Taula 45. Absència de associació entre l'expressió de Catepsina S en mostres de carcinoma i a la PIN. Agrupació en dues categories.

c.3.2) Expressió de les catepsines B i S i paràmetres clínico-patològics

S'han comprovat diversos intervals de positivitat sense trobar cap relació significativa entre la Cat B i la Cat S amb els paràmetres clínico-patològics analitzats, incloent l'estadi tumoral i el patró combinat de Gleason. L'estudi de la Cat S no mostrà cap dada d'interés al relacionar aquest enzim amb els paràmetres clínico-patològics.

(Pàgina següent) Taula 46. Expressió de Catepsina B i paràmetres clínico-patològics.

VARIABLE	N	Cat B = 0	Cat B >0 - < 10	Cat B 10 - 50	Cat B > 50	p + vs -
Edat (anys) ≤ 65 > 65	20 24	3 (15,0) 9 (37,5)	7 (35,0) 6 (25,0)	9 (45,0) 9 (37,5)	1 (5,0) 0 (0,0)	0,095
Grau (Gleason) 2 - 6 7 - 10	25 19	6 (24,0) 6 (31,6)	7 (28,0) 6 (31,6)	11 (44,0) 7 (36,8)	1 (4,0) 0 (0,0)	NS
Estadi (patològic) pT2 pT3	29 15	8 (27,6) 5 (33,3)	10 (34,5) 4 (26,7)	10 (34,5) 6 (40,0)	1 (3,4) 0 (0,0)	NS
Marge de resecció Lliure Afectat	20 24	7 (35,0) 5 (20,8)	5 (25,0) 8 (33,3)	8 (40,0) 10 (41,7)	0 (0,0) 1 (4,2)	NS
Invasió perineural No Sí	28 16	7 (25,0) 5 (31,3)	8 (28,6) 5 (31,3)	12 (42,8) 6 (37,4)	1 (3,6) 0 (0,0)	NS
Invasió de seminals (pT3) No Sí	10 5	3 (30,0) 2 (40,0)	1 (10,0) 3 (60,0)	6 (60,0) 0 (0,0)	0 (0,0) 0 (0,0)	NS
Metàstasis ganglionars No Sí	28 4	8 (28,6) 1 (25,0)	7 (25,0) 2 (50,0)	12 (42,8) 1 (25,0)	1 (3,6) 0 (0,0)	NS
PSA preoperatori ≤ 20 > 20	29 10	6 (20,7) 4 (40,0)	9 (31,0) 2 (20,0)	13 (44,8) 4 (40,0)	1 (3,4) 0 (0,0)	NS
Recidiva del PSA No Sí	21 13	4 (19,0) 4 (30,8)	6 (28,6) 4 (30,8)	11 (52,4) 5 (38,5)	0 (0,0) 0 (0,0)	NS
Moment de la recidiva del PSA ≤ 6 mesos > 6 mesos	8 5	3 (37,5) 1 (20,0)	2 (25,0) 2 (40,0)	3 (37,5) 2 (40,0)	0 (0,0) 0 (0,0)	NS
Tractament previ No Sí	32 8	9 (28,1) 2 (25,0)	8 (25,0) 3 (37,5)	15 (46,9) 2 (25,0)	0 (0,0) 1 (12,5)	NS
Ploidia Diploide No diploide	32 7	8 (25,0) 3 (42,9)	11 (34,4) 1 (14,3)	12 (37,5) 3 (42,9)	1 (3,1) 0 (0,0)	NS
Fracció de Fase S ≤ 3,50 > 3,50	21 18	7 (33,3) 4 (22,2)	5 (23,8) 7 (38,9)	8 (38,1) 7 (38,9)	1 (4,8) 0 (0,0)	NS
Fracció de Fase S aneuploide ≤ 3,50 > 3,50	4 3	2 (50,0) 1 (33,3)	1 (25,0) 0 (0,0)	1 (25,0) 2 (66,7)	0 (0,0) 0 (0,0)	NS

VARIABLE	N	Cat S = 0	Cat S > 0 - < 10	Cat S 10 - 50	Cat S > 50	p + vs. -
Edat (anys)						
≤ 65	20	3 (15,0)	11 (55,0)	4 (20,0)	2 (10,0)	NS
> 65	21	4 (19,0)	7 (33,3)	9 (42,9)	1 (4,8)	
Grau (Gleason)						
2 - 6	23	3 (13,0)	11 (47,8)	7 (30,4)	2 (8,7)	NS
7 - 10	18	4 (22,2)	7 (38,9)	6 (33,3)	1 (5,6)	
Estadi (patològic)						
pT2	27	3 (11,1)	13 (48,1)	9 (33,3)	2 (7,4)	NS
pT3	14	4 (28,6)	5 (35,7)	4 (28,6)	1 (7,1)	
Marge de resecció						
Lliure	18	3 (16,7)	10 (55,5)	5 (27,8)	0 (0,0)	NS
Afectat	23	4 (17,4)	8 (34,8)	8 (34,8)	3 (13,0)	
Invasió perineural						
No	26	5 (19,2)	10 (38,5)	9 (34,6)	2 (7,7)	NS
Sí	15	2 (13,3)	8 (53,3)	4 (26,7)	1 (6,7)	
Invasió de seminals (pT3)						
No	9	4 (44,5)	3 (33,3)	2 (22,2)	0 (0,0)	NS
Sí	5	0 (0,0)	2 (40,0)	2 (40,0)	1 (20,0)	
Metàstasis ganglionars						
No	24	5 (20,8)	13 (54,2)	5 (20,8)	1 (4,2)	NS
Sí	4	0 (0,0)	1 (25,0)	2 (50,0)	1 (25,0)	
PSA preoperatori						
≤ 20	27	2 (7,4)	13 (48,2)	10 (37,0)	2 (7,4)	NS
> 20	8	3 (37,5)	3 (37,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	
Recidiva del PSA						
No	18	4 (22,2)	10 (55,6)	3 (16,7)	1 (5,6)	NS
Sí	12	1 (8,3)	5 (41,7)	4 (33,3)	2 (16,7)	
Moment de la recidiva del PSA						
≤ 6 mesos	6	1 (16,7)	2 (33,3)	1 (16,7)	2 (33,3)	NS
> 6 mesos	6	0 (0,0)	3 (50,0)	3 (50,0)	0 (0,0)	
Tractament previ						
No	30	4 (13,3)	15 (50,0)	8 (26,7)	3 (10,0)	NS
Sí	6	2 (33,3)	1 (16,7)	3 (50,0)	0 (0,0)	
Ploidia						
Diploide	30	3 (10,0)	15 (50,0)	10 (33,3)	2 (6,7)	NS
No diploide	5	2 (40,0)	2 (40,0)	1 (20,0)	0 (0)	
Fracció de Fase S						
≤ 3,50	18	1 (5,6)	9 (50,0)	6 (33,3)	2 (11,1)	NS
> 3,50	17	4 (23,5)	8 (47,1)	5 (29,4)	0 (0)	
Fracció de Fase S aneuploide						
≤ 3,50	2	0 (0)	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0)	NS
> 3,50	3	2 (66,7)	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	

(Pàgina anterior). Taula 47. Expressió de Catepsina S i paràmetres clínico-patològics.

c.3.3) Coexpressió de Catepsina B i S

S'evidecià una coexpressió d'ambues catepsines en el 62 % de les mostres de carcinoma i en el 78 % de les mostres de PIN. Les mostres amb absència d'expressió simultània d'ambdues catepsines foren molt poques, 2 de tumorals (5 %) i 1 de PIN (4 %).

Dels 9 carcinomes negatius per la Cat B, s'avaluà concomitantment la PIN d'alt grau en 6 casos, dels quals 3 foren positius per Cat B. Només 1 dels 6 casos Cat S negatius en els carcinomes presentà una PIN coincidental, que va ser positiva.

Malgrat l'elevada coexpressió d'ambdues catepsines, a l'estudi estadístic no s'evidecià una associació significativa entre l'expressió de Cat B i Cat S avaluada tant a les mostres de PIN, com a les mostres de carcinoma. Aquest fet pot ser degut possiblement a la desproporció de casos entre les diverses categories.

VARIABLE Cat B	N	Cat S PIN = 0	Cat S PIN > 0	p
Cat B PIN = 0	3	1 (4,3)	2 (8,7)	NS
> 0	20	2 (8,7)	18 (78,3)	

Taula 48. Relació entre l'expressió a la PIN de la Catepsina B i Catepsina S. Agrupació en dues categories.

VARIABLE Cat B	N	Cat S = 0	Cat S > 0	p
Cat B = 0	10	2 (5,1)	8 (20,5)	NS
> 0	29	5 (12,8)	24 (61,5)	

Taula 49. Relació entre l'expressió de Catepsina B i Catepsina S en carcinomes. Agrupació en dues categories.

c.3.4) Expressió de Catepsina B i S i resta de marcadors immunohistoquímics

a) Relació de l'expressió de Catepsina B amb p53 i Bcl-2:

No s'evidencià cap associació significativa entre Cat B i p53.

Pel que fa a Bcl-2, s'avaluaren un total de 42 mostres. De les mostres amb absència d'expressió de Bcl-2, en 29 casos (81 %) s'observà expressió de Catepsina B. En canvi, només en 2 casos (33 %) amb expressió de Bcl-2 s'observà expressió de Catepsina B. Per tant, s'evidència una relació inversa entre l'expressió de Catepsina B i Bcl-2 ($p = 0,032$).

VARIABLE Bcl-2	N	Cat B = 0	Cat B > 0	p
Bcl-2 = 0	36	7 (19,4)	29 (80,6)	0,032
> 0	6	4 (66,7)	2 (33,3)	

Taula 50. Relació entre l'expressió de Catepsina B amb Bcl-2. Agrupació en dues categories.

b) Expressió de Catepsina S amb p53 i Bcl-2:

Respecte a p53, s'avaluaren un total de 36 mostres. En cap cas s'observà absència d'expressió de catepsina S i de p53. Quan p53 fou positiva, en 17 casos (74 %) s'observà expressió de catepsina S. També fou destacable que p53 es sobreexpressés en tots els casos amb absència d'expressió de Cat S. En canvi, en 13 casos s'observà expressió de catepsina S amb p53 negativa. Aquests resultats són d'avaluació una mica complexa, però sembla observar-se una tendència a la relació inversa entre ambdós marcadors, de forma quasi significativa ($p = 0,068$).

La relació entre la Cat S i Bcl-2 no aporta dades significatives.

VARIABLE	N	Cat S = 0	Cat S > 0	p
p53				
= 0	13	0 (0)	13 (100)	0,068
> 0	23	6 (26,1)	17 (73,9)	
Bcl-2				
= 0	34	4 (11,8)	30 (88,2)	NS
> 0	5	2 (40,0)	3 (60,0)	

Taula 51. Relació entre l'expressió de Catepsina S amb p53 i Bcl-2.

c) Expressió de Catepsines B i S amb p21^{Waf1/Cip1} i p27^{Kip1}:

No s'observà cap relació significativa entre l'expressió d'ambdues catepsines en carcinomes amb la p21^{Waf1/Cip1} i la p27^{Kip1}.

D. RESUM DELS RESULTATS OBTINGUTS

Un resum dels resultats obtinguts es detalla a continuació:

	p53	Bcl-2	p21^{Waf1/Cip1}	p27^{Kip1}	CAT B	CAT S
EDAT					0,095(*)	
GRAU	0,008	0,041	0,100	0,029		
ESTADI	0,013			0,062		
MARGE DE RESECCIÓ	0,029	0,012	0,068			
INVASIÓ PERINEURAL				0,014		
PSA PRE-OPERATORI		0,054	0,083			
RECIDIVA DEL PSA						
TRACT. PREVI			0,005			
PLOIDIA		0,064				
FASE S GLOBAL	0,014					

Taula 52. Resum de les associacions significatives ($p < 0,05$) i quasi significatives ($p < 0,10$) obtingudes a l'analitzar les variables experimentals amb les variables clínicopatològiques als carcinomes. La relació entre variables és directa a excepció dels casos assenyalats amb un asterisc (*) en els quals fou inversa. Les caselles buides corresponen a associacions no significatives amb una $p > 0,10$.

p53						
Bcl-2						
p21^{Waf1/Cip1}		0,001				
p27^{Kip1}						
CAT B		0,032 (*)				
CAT S	0,068 (*)					
	p53	Bcl-2	p21^{Waf1/Cip1}	p27^{Kip1}	CAT B	CAT S

Taula 53. Resum de les associacions significatives ($p < 0,05$) i quasi significatives ($p < 0,10$) obtingudes a l'analitzar les variables experimentals entre sí. La relació entre variables és directa a excepció dels casos assenyalats amb un asterisc (*) en els quals fou inversa. Les caselles buides corresponen a associacions no significatives amb una $p > 0,10$.

(Pàgina següent). Fig. 37. Variació en els perfils d'expressió immunofenotípica dels marcadors de cicle cel.lular i apoptosi en els diferents casos estudiats i comparació amb el grau de Gleason, fase S global i recidiva del PSA.

Significat del color vermell: p53 (+), Bcl-2 (+), p21^{Waf1/Cip1} (+) \geq 5% de cèl.lules, p27^{Kip1} (+) \leq 30% de cèl.lules, grau de Gleason \geq 7, Fase S global $>$ 3,50 i Recidiva del PSA (+).

Significat del color verd: p53 (-), Bcl-2 (-), p21^{Waf1/Cip1} (+) $<$ 5% de cèl.lules, p27^{Kip1} (+) $>$ 30% de cèl.lules, grau de Gleason \leq 6, Fase S global \leq 3,50 i Recidiva del PSA (-).

	p53	Bcl-2	p21 ^{Waf1/Cip1}	p27 ^{Kip1}	GRAU	FASE S	RECID.
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							
31							
32							
33							
34							
35							
36							
37							
38							
39							
40							
41							
42							
43							
44							
45							
46							
47							
48							
49							
50							
51							
52							

V. DISCUSSIÓ

Actualment, està ben establert que en els gens reguladors del cicle cel.lular succeeixen importants alteracions que intervenen en el procés carcinogenètic "in vitro". L'aplicació de tècniques immunohistoquímiques a l'estudi de teixits neoplàsics procedents de mostres anatomo-patològiques ha permès comprovar que aquestos fenòmens també s'observen "in vivo". Entre les neoplàsies que més atenció dels investigadors estan atraent a nivell mundial s'hi troba sense dubte el CP, per les raons ja esmentades a la introducció, entre les quals s'hi troba la incidència, mortalitat, l'escàs coneixement dels seus mecanismes de carcinogènesi i la manca de tractament efectiu.

Per tal d'intentar col.laborar a arribar a una millor coneixença dels mecanismes que expliquin i ajudin a combatre aquesta neoplàsia, els grups d'investigació sobre aquesta entitat estan prestant una atenció especial a les possibles anomalies que apareixen a la regulació del cicle cel.lular, l'apoptosi i els mecanismes d'invasió neoplàsica del CP. Per això, aquest estudi va plantejar l'anàlisi d'alteracions en proteïnes involucrades a la progressió del CP des del seu estadi preinvasiu fins el moment de la invasió metastàsica. S'han comprovat que, efectivament, es produeixen diversos tipus d'anomàlies en la progressió del CP, la qual cosa confirma la complexitat del procés carcinogènic.

A. PARÀMETRES CLÍNICO-PATOLÒGICS

La major part de les correlacions entre els paràmetres clínicopatològics van ser les esperades per nosaltres, donat que es ben coneguda llur influència en l'evolució i pronòstic d'aquesta neoplàsia. Així, per exemple, mereix la pena destacar la forta correlació positiva que hi hagué entre el grau histològic i altres paràmetres com l'estadi tumoral, marge de resecció, invasió perineural, metàstasis ganglionars, PSA preoperatori i recidiva del PSA. En aquest sentit, també cal destacar l'associació observada entre la ploidia i la fase S global.

A més, resultà interessant la correlació entre el PSA preoperatori i l'afectació del marge de resecció, que podria ser deguda a una accés més fàcil d'aquesta molècula al torrent sanguini després de l'extensió local de la neoplàsia, la qual resulta de més difícil resecció.

Resulta lògic, però no per això menys important, la constatació de la correlació entre l'afectació del marge de resecció, invasió de vesícules seminals i PSA preoperatori amb la recidiva del PSA. Quelcom semblant succeeix també pel que fa a l'associació entre el tractament previ del malalt i la més gran tardança en la recidiva del PSA.

B. p53, Bcl-2 i p21^{Waf1/Cip1}

Un primer objectiu d'aquesta tesi era conèixer les possibles alteracions en l'expressió de p53, Bcl-2 i p21^{Waf1/Cip1}. Actualment, es sap que aquestos 3 moduladors es troben en vies de regulació del cycle celular i apoptosi, per la qual cosa es va considerar interessant l'anàlisi de les possibles coincidències en les seves alteracions.

B.1. p53

La mutació del gen supressor tumoral TP53 ha estat implicada des de fa anys en la tumorigènesi de molts tipus de neoplàsies malignes humanes³²⁵. Aquestes mutacions són freqüents en una gran varietat de tumors. De tota manera, a la pròstata la freqüència de mutacions de p53 descrites és força variable, variant segons diversos autors entre el 0 i el 42%^{326, 327}, la qual cosa pot significar un paper important d'aquest gen a la tumorigènesi. Això ha conduït a que nombrosos grups d'investigació arreu del món s'hagin interessat pel paper d'aquest gen en el CP, havent estades publicats un bon grapat de treballs. No obstant, tot i la gran quantitat d'informació existent sobre aquest tema, l'evidència que considera el paper del gen TP53 en la carcinogènesi i progressió del CP continua essent motiu de controvèrsia.

L'avaluació immunohistoquímica de la sobreexpressió de p53 ha donat lloc a abundant literatura on aquesta anormalitat s'ha trobat amb assiduitat a un ampli rang entre el 2 i el 79% dels carcinomes de pròstata^{318, 326, 328-330}. Tot i això, en un estudi antic s'ha referit una immunoreactivitat enfront de la proteïna p53 de fins a un 97% dels casos²⁷⁰. A més, hi ha una informació contradictòria en relació a l'estadi de l'evolució de la neoplàsia en el qual s'obtingué aquesta expressió. Segons alguns autors, aquest event ja s'observa en l'epiteli prostàtic normal o després de radioteràpia^{279, 331}, després del desenvolupament d'hiperplàsia³³² o pot ser vist en epiteli displàsic^{271, 272, 333}. Les darreres observacions més probablement representen una expressió transitòria de p53 normal després de la inducció per diversos estímuls proliferatius i/o nocius més que deguda a anormalitats genòmiques. De tota manera, en la major part dels estudis s'ha proposat que la sobreexpressió de p53 és un esdeveniment rar i tardà, més freqüentment identificat a les metàstasis^{334, 335}.

En el teixit normal, hem trobat evidència de sobreexpressió de p53 a les cèl.lules basals, tot i què de forma ocasional. La concepció actual que es té de la cèl.lula basal com a cèl.lula proliferant i, possiblement, com a cèl.lula mare de l'epiteli prostàtic ens fa pensar que l'expressió focal de p53 nativa es donaria en cèl.lules basals que haurien deixat de proliferar. És possible que aquestes cèl.lules hagin finalitzat la seva tasca dins de la glàndula prostàtica, tornant-se senescents. D'altra banda, es possible també que les cèl.lules basals hagin patit de dany genòmic durant el seu procés de diferenciació. En tot cas, tot això hauria comportat l'activació de p53 per tal de procedir a la seva eliminació per apoptosi i ésser substituïda per una cèl.lula basal més jove.

En les lesions preneoplàsiques, la troballa de positivitat, en algunes cèl.lules basals i luminals, es podria correspondre amb una sobreexpressió de p53 nativa, potser com a resposta enfront de la pròpia transformació neoplàsica. En aquest cas, es possible que la p53 nativa estigués afavorint, sense èxit aparent, una resposta de l'hoste vers aquesta transformació, intentant que aquestes cèl.lules transformades entressin en una via apoptòtica i fossin finalment eliminades.

En les mostres corresponents als carcinomes, la sobreexpressió de p53 es caracteritzà pel següent: a) un rang ampli de pacients que expressà p53, b) una mitjana del percentatge de cèl.lules tenyides baix i c) la tendència a l'agrupació a determinades zones de la tumoració, originant la formació de "clusters". Els nostres resultats han evidenciat una associació significativa amb un grau histològic alt i amb un estadi avançat^{278, 279, 330, 336, 337} en consonància amb la major part dels estudis sobre el tema, malgrat que en altres estudis no s'ha trobat aquesta relació pel que fa al grau histològic^{270, 310, 318, 338, 339} i a l'estadi tumoral^{318, 338-341}. S'ha demostrat que aquesta immunoreactivitat augmenta a les metàstasis, si es compara amb el tumor primari aparellat^{342, 343}. D'altra banda, s'ha provat de definir el paper de les mutacions de TP53 al CP³⁴³⁻³⁴⁷, les quals s'han trobat essencialment en tumors d'estadi avançat, on podria estar relacionat amb resistència als andrògens³⁴⁸.

La troballa d'associació significativa de l'expressió de p53 amb un grau histològic alt i amb un estadi TNM avançat, ens fa pensar que p53 es podria sobreexpressar en subpoblacions de la tumoració visualitzades com a "clusters" que confereixin una més gran agressivitat al tumor, amb una pèrdua de la diferenciació i l'adquisició de característiques morfològiques de més gran malignitat. Aquesta dada també ha estat comentada en algunes publicacions recents^{329, 330, 349-351} i per l'observació que els tumors amb un augment de la positivitat de p53 presentaven índexs de proliferació més alts, tal com s'indica en alguns treballs^{318, 336, 340, 352, 353}, encara que en altres estudis no s'ha trobat aquesta relació^{270, 310, 354}. D'entrada hom pot pensar en una contradicció pel que fa a la relació existent entre p53 i un augment de la fase S, ja que p53 és un gen supressor tumoral i, per tant, controla la proliferació cel.lular. Una explicació per aquest fet podria ser que p53 es trobés mutada. Totes aquestes troballes també justifiquen els criteris d'avaluació immunohistoquímics emprats en l'avaluació immunohistoquímica de p53 en aquest estudi, a l'haver trobat associacions significatives considerant qualsevol tipus d'expressió de p53 com a positiva.

No hem evidenciat associació significativa entre p53 i el PSA pretractament, a l'igual que en diversos estudis publicats ^{318, 338-339, 355, 356} i a diferència d'altres estudis ^{330, 355, 356}. S'ha suggerit que nivells de PSA elevats també definirien poblacions tumorals més agressives ³⁵⁷. Aquest extrem no s'ha pogut demostrar amb els nostres resultats, si bé no és descartable, donada l'associació significativa del grau i l'estadi tumoral amb l'expressió de p53 i també amb els nivells elevats de PSA pretractament.

Respecte a altres variables estudiades, els nostres resultats són semblants als descrits a la literatura. Així s'ha trobat descrita en estudis previs una associació amb l'afectació del marge tumoral ^{270, 338} i una absència d'associació amb: l'edat ^{338, 358}, amb, afectació de les vesícules seminals ²⁷⁰, afectació de ganglis regionals ^{270, 359}, administració de tractament previ ³⁶⁰, recidiva del PSA ³³⁹ i ploidia cel.lular ³⁵⁸. Malgrat la coincidència de resultats, en diverses ocasions també s'han detectat discrepàncies, com l'associació significativa de l'expressió de p53 amb una absència d'afectació del marge ³⁶¹ i, sobretot, amb l'aparició de recidiva del PSA ^{337, 350, 362-364}.

Possibles explicacions per les discrepàncies abans descrites són: a) la disparitat dels anticossos utilitzats, que només poden detectar o no la proteïna mutada (la majoria de les publicacions recents que inclouen l'estudi immunohistoquímic de l'expressió de p53 a la pròstata s'han realitzat utilitzant el clon DO-7 ^{329, 330, 339, 349, 362}, i més recentment, diversos estudis han utilitzat també el clon 1801 ^{318, 350}. Per realitzar el nostre estudi s'ha utilitzat el clon BP53-12, que, al igual que els anteriors, reconeix tant la forma mutada com la nativa de p53 ^{338, 365-366}), b) els diferents protocols immunohistoquímics utilitzats en ls quals la sensibilitat pot variar àmpliament amb el mètode (peroxidasa-antiperoxidasa, avidina-biotina, estreptavidina-biotina, etc.) i amb l'ús o no de desenmascarament antigènic (digestió, calentament amb microones, tractament amb olla a pressió, etc), c) els criteris i mètode d'avaluació (negativitat absoluta contra qualsevol tipus de positivitat, diferents percentatges de punt de tall, morfometria contra ull nu), d) variabilitat en la mida de les mostres avaluades (biòpsia per agulla, resecció transuretral, peces de prostatectomia amb diferents expressions a diferents focus, etc.) i e) diferències

etiopatogèniques entre els diferents països. No és, per tant, sorprenent que diferents opinions siguin expressades respecte a la utilitat d'aquest marcador com a factor pronòstic a la patologia prostàtica.

D'aquests resultats es conclou que la sobreexpressió de p53 és més freqüent en fases avançades (carcinoma infiltrant) de la transformació neoplàsica prostàtica, mentre que la seva aparició esporàdica al teixit normal i PIN probablement sigui deguda a sobreexpressió transitòria de p53 nativa. La correlació observada amb l'afectació del marge de resecció així com amb l'augment de la fase S estaria motivada per l'efecte del grau de Gleason sobre aquestes variables.

B.2. Bcl-2

La proteïna Bcl-2 ha estat menys estudiada que p53 en el CP i la sobreexpressió detectada per mètodes immunohistoquímics s'ha observat en un percentatge menor de tumors primaris que l'expressió de p53^{329, 336, 337, 350, 367}. La detecció immunohistoquímica de Bcl-2 s'ha reportat en diversos carcinomes, com el de mama, ovari, colon, nasofaringe³⁶⁸⁻³⁷¹ i, també, el de pròstata. Un estudi amb mostres consecutives de prostatectomia de malalts no tractats prèviament va suggerir que la presència de Bcl-2 estava associada amb un pitjor pronòstic, especialment quan es combinava amb una alta Ki-67³⁷².

La distribució de l'expressió de Bcl-2 en les nostres mostres va adoptar una interessant distribució bimodal, amb dos pics, el primer del qual es trobava en les cèl.lules basals en el teixit benigne, així com a la PIN d'alt grau. El segon, menys marcat, el vam trobar a les cèl.lules corresponents a tumors de més alt grau histològic.

Independentment, també es va observar expressió a algunes glàndules atròfiques. Es podria pensar en una contradicció, donat que Bcl-2 és un inhibidor de l'apoptosi i l'atròfia, quan és difusa i d'origen hormonal, mostra

elevats nivells d'apoptosi ³⁰⁴. També és possible que aquestes glàndules atròfiques que s'han observat enmig de zones de carcinoma, expressin Bcl-2 per interacció amb el microambient originat a partir de la proliferació neoplàsica. De tota manera, atròfia no ha d'implicar necessàriament apoptosi i, en aquest cas, és possible que algunes glàndules atròfiques es trobin en un estat de quiescència amb una supervivència perllongada manifestada amb l'expressió de Bcl-2 o puguin pertànyer a l'entitat anomenada Atròfia Inflamatòria Proliferativa (PIA), on l'apoptosi és un fenomen poc freqüent ³⁰⁴. Fins i tot, aquestes glàndules podrien ésser novament estimulades, amb la qual cosa incrementarien de nou la seva proliferació i podrien ésser susceptibles de desenvolupar una hiperplàsia postatròfica.

L'aparició del primer pic a l'etapa normal i, sobretot a la fase preinvasiva, ens fa pensar que la inhibició de l'apoptosi seria un tret important de les cèl.lules basals normals així com les que caracteritzen la PIN. Aquesta troballa podria ser explicada per la suposada activitat proliferativa que caracteritza les cèl.lules basals normals. L'expressió de Bcl-2 podria ser una característica normal a les cèl.lules mare de la pròstata. Així, per tal d'ajudar a la seva diferenciació, s'inhibirien les vies apoptòtiques en aquest tipus de cèl.lules, possiblement regulades per andrògens tal com s'han suggerit en alguna publicació ³⁷³, i se n'afavoriria la seva proliferació. Tanmateix, el suposat augment en la supervivència que cal esperar en aquestes cèl.lules podria comportar una més gran probabilitat de patir mutacions i progressar cap a PIN. Un cop a la fase de PIN, en un ambient favorable, l'expressió de Bcl-2 es mantindria a les cèl.lules basals i també es podria arribar a observar a les cèl.lules luminals. Aquest manteniment de l'expressió de Bcl-2 en cèl.lules més diferenciades ens fa pensar que possiblement hi hagin altres mecanismes implicats, com alteracions en l'estimulació androgènica o la presència d'altres tipus de mutacions, fets que no poden ser comprovats amb els objectius establerts en aquest estudi. De tota manera, estudis recents suggereixen l'existència de vies de regulació entre els andrògens i Bcl-2 ^{260, 374}, malgrat no disposar actualment de dades que confirmin totalment aquestes troballes.

En el nostre estudi, la detecció d'immunoreactivitat per a Bcl-2 a la PIN fou destacable (65%). Resultats similars s'han reportat en tres d'aquests estudis ³⁷⁵⁻³⁷⁷, on la immunoreactivitat forta per Bcl-2 fou evident en més del 50% de les mostres de PIN avaluades, mentre que en altres 3 estudis, només el 17-35 % de les mostres de PIN foren Bcl-2 positives ^{260, 335, 378}. A més, el primer estudi publicat no va reportar sobreexpressió de Bcl-2 a la PIN ³⁷⁹.

El segon pic d'expressió de Bcl-2 es trobà associat a carcinomes invasius preferentment d'alt grau. Per tal d'explicar aquest fet, es pot postular que Bcl-2 seria un mecanisme utilitzat per cèl.lules indiferenciades en el carcinoma de pròstata d'alt grau, per tal d'evitar l'apoptosi. Això es podria aconseguir amb l'afavoriment per part d'aquestes cèl.lules de la mutació del gen bcl-2, la qual cosa podria significar l'expressió d'una proteïna Bcl-2 mutada que no respondria a altres moduladors com els andrògens o p53. Aquesta hipòtesi es veu recolzada pel fet que la sobreexpressió de Bcl-2 s'ha associat amb progressió de la malaltia i CP hormono-independent amb amplificació del receptor d'andrògens. ^{298, 299, 378}. Una altra possibilitat es basa en l'evidència d'una regulació inapropiada del gen bcl-2 no alterat genèticament mitjançant mutacions de p53, defectes en la via supressora tumoral de p53 i/o desregulació dels membres de la família BCL-2, com Bax ^{378, 380-382}.

Dels 49 CP primaris corresponents al nostre estudi, només s'ha trobat immunoreactivitat per Bcl-2 en pocs casos (14 %). En la majoria dels casos, la incidència publicada prèviament ha variat àmpliament (3-87 %) ^{340, 350, 375, 383-385}. Algunes d'aquestes variacions poden ser atribuïdes a un nivell lliardar de positivitat o a diferències entre les poblacions de pacients presents a diferents institucions. D'altra banda, pot reflectir també diferències en els anticossos utilitzats i a la relativa preservació dels antígens. No obstant, en tots els estudis, incloent aquest, la tinció de Bcl-2 fou sempre heterogènia a les àrees de càncers.

Hi han resultats conflictius sobre la relació entre immunoreactivitat de Bcl-2 i grau tumoral. En 2 estudis, l'expressió de Bcl-2 tendia a ser més freqüent en tumors d'alt grau ^{376, 378} i en el nostre estudi aquesta diferència ha

estat significativa a l'igual que en diverses publicacions^{317, 340, 376}. En canvi, no hem trobat associació amb l'estadi tumoral, fet corroborat per diversos estudis^{270, 340, 374, 383-385}. No obstant, en altres estudis no s'observà correlació entre expressió de Bcl-2 amb el grau histològic^{270, 336, 378, 383, 386}, però sí amb l'estadi tumoral^{317, 336, 364, 372}.

Respecte a altres variables, hem trobat uns resultats semblants als obtinguts en altres estudis. Així, s'ha descrit una associació significativa amb els nivells de PSA preoperatori³⁸⁷ i amb la ploidia cel.lular^{315, 317}. De tota manera, els nostres resultats han estat quasi significatius. En canvi, en nombrosos estudis s'ha observat absència d'associació amb l'edat³⁷⁶, l'afectació de les vesícules seminals²⁷⁰, l'afectació de ganglis regionals³⁷², la recidiva dels nivells de PSA³³⁷, l'administració de tractament previ³⁷⁶ i la proliferació cel.lular^{260, 270, 336, 340, 372}.

Discrepàncies amb els resultats obtinguts es troben en un petit nombre de publicacions. Així, a diferència de nosaltres, s'ha reportat una associació significativa amb la recidiva del PSA³⁵⁰ i amb la proliferació cel.lular^{317, 353}, i una absència d'associació amb l'afectació del marge de resecció²⁷⁰. En el nostre estudi, aquesta relació amb el marge afectat podria ser dependent del grau histològic, la qual cosa explicaria aquesta discrepància de resultats observada.

Tot i que s'ha reportat que l'expressió de Bcl-2 típicament succeeix en CP en estadis avançats³⁸⁸ i, per tant, probablement representa un esdeveniment tardà en el desenvolupament del CP. Els nostres resultats suggereixen que la sobreexpressió de Bcl-2 és un esdeveniment precoç a la carcinogènesi prostàtica. Aquest fet fa que, probablement, la perllongació de la supervivència cel.lular doni lloc a que les cèl.lules de PIN es tornin més vulnerables a altres oncògens, els quals podrien induir etapes posteriors en el procés de tumorogènesi. Així, és probable que l'expressió de Bcl-2 estigui també implicada, encara que possiblement en menor grau, en la tumorogènesi inicial a la pròstata.

B.3. p21^{Waf1/Cip1}

p21^{Waf1/Cip1}, com p53, és un gen supressor que té una funció inhibidora dels complexos cdk/ciclina. L'expressió de p21^{Waf1/Cip1} a les mostres del nostre estudi ha estat força variable i, aparentment, no ha semblat que adoptés cap patró definit, tant en les mostres de teixit normal, PIN i en els carcinomes. Aquestos resultats contradiuen les troballes d'alguns autors que no van observar expressió de p21^{Waf1/Cip1} en el teixit normal³⁸⁹ o només en escasses cèl.lules basals³⁹⁰. Si s'exceptua la relació amb el tractament previ, tampoc s'ha observat cap associació significativa amb els diversos paràmetres clínicopatològics, a diferència d'altres tipus de carcinoma, com el de mama, on sí s'ha trobat relació amb el grau tumoral³¹³. De tota manera, si que s'ha observat una tendència a relacionar-se p21^{Waf1/Cip1} amb el grau, marge de resecció i recidiva del PSA, malgrat no haver obtingut resultats significatius. Això ens va fer pensar que els mecanismes de regulació de p21^{Waf1/Cip1} serien força complexos i, àdhuc, múltiples i no podrien ser explicats totalment amb els estudis experimentals realitzats en aquesta tesi. Aquesta idea és recolzada pel fet que, malgrat ser un gen supressor tumoral, les mutacions del gen p21^{Waf1/Cip1} són rares i pel fet que estudis amb ratolins "knock-out" per p21^{Waf1/Cip1} no han evidenciat un augment significatiu en el desenvolupament de tumors¹⁸².

A la nostra sèrie, pocs casos (14 %) foren totalment negatius per p21^{Waf1/Cip1} i en casos positius per p21^{Waf1/Cip1} la variació de la fracció de p21^{Waf1/Cip1} a les cèl.lules tumorals positives no fou excessivament àmplia (0 - 35 %). Aquestes dades contrasten una mica amb les obtingudes per altres autors. Així, s'ha reportat una variació en la fracció de p21^{Waf1/Cip1} a les cèl.lules tumorals positives entre el 17 i el 75 %^{275, 276, 279, 318, 389}.

Hem observat també un augment dels nivells de p21^{Waf1/Cip1} associat significativament amb l'administració de tractament abans de la cirurgia²⁷⁵. Això fa pensar que el tractament previ podria alterar la regulació transcripcional de p21^{Waf1/Cip1}, per un mecanisme no necessàriament dependent de p53 donat

que no s'ha trobat cap associació del tractament previ amb p53. Aquesta alteració sembla afectar només a cèl.lules tumorals invasives i no s'ha observat relació amb cèl.lules normals ni amb la PIN en els malalts tractats.

A diferència d'altres tipus tumorals, no hem trobat associació significativa de la sobreexpressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ amb el grau i estadi tumoral, encara que la relació entre $p21^{Waf1/Cip1}$ i el grau fou quasi significativa. Els nostres resultats segueixen la mateixa línia que les troballes de diversos autors pel que fa al grau tumoral^{278, 318, 390} i a l'estadi tumoral^{279, 318, 390}, mentre que d'altres si han trobat associació significativa entre expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ i grau tumoral^{279, 389, 391} i amb l'estadi tumoral^{389, 391}. En el càncer de colon, l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ està relacionada amb tipus tumorals no invasius³⁹² o, d'acord amb una publicació prèvia, l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ és independent de la seva profunditat d'invasió³⁹³. Conseqüentment, al CP, $p21^{Waf1/Cip1}$ està associat amb un estadi clínic inicial³⁹⁴ i al càncer de mama el senyal incrementat de $p21^{Waf1/Cip1}$ correlaciona amb un alt grau i la negativitat dels ganglis limfàtics³¹³. No obstant, una anàlisi recent de quasi 200 casos de carcinomes de bufeta revelen una relació significativa entre $p21^{Waf1/Cip1}$ i un alt grau i estadi³⁹⁵.

Malgrat l'absència d'associació significativa entre l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ i grau tumoral, els resultats obtinguts requereixen d'una interpretació més acurada. Així, si partim de la idea que $p21^{Waf1/Cip1}$ és un gen supressor tumoral i, per tant, la seva funció és la de produir l'aturada del cicle cel.lular i inhibir el creixement cel.lular, podem deduir que els nivells de $p21^{Waf1/Cip1}$ haurien de ser més elevats a les cèl.lules normals i cèl.lules tumorals més ben diferenciades, tal com succeeix amb la $p27^{Kip1}$. Tanmateix, vam trobar tot el contrari, amb una mitjana d'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ en els tumors d'alt grau que superava d'un 50% la mitjana de $p21^{Waf1/Cip1}$ en els tumors de baix grau. Això és corroborat pel fet que en tumors citològicament heterogenis, les cèl.lules amb nuclis més grans i bigarrats mostraren una expressió més intensa de $p21^{Waf1/Cip1}$, havent-se observat aquest fet també en carcinomes de mama³¹³. L'augment de $p21^{Waf1/Cip1}$ podria ser un mecanisme

posat en marxa per aquest tipus de tumors per frenar la proliferació i l'acumulació d'errors genètics.

La nostra troballa d'una absència d'associació entre $p21^{Waf1/Cip1}$ i els nivells de PSA preoperatori, s'ha evidenciat també en un altre estudi ³¹⁸, el qual, malauradament, també va reportar una associació significativa entre la recidiva del PSA i $p21^{Waf1/Cip1}$, aspecte que no hem demostrat en el nostre treball.

D'altra banda, no hem trobat una associació significativa amb la proliferació cel.lular, a diferència dels estudis publicats fins ara ^{269, 318, 389}. A la nostra sèrie, els tumors amb menor fase S mostraren nivells de $p21^{Waf1/Cip1}$ baixos en 11 casos, la qual cosa pot significar que siguin tumors poc proliferants i, per tant, que no calguin grans nivells de $p21^{Waf1/Cip1}$ per tractar d'impedir el seu creixement o que hi hagin altres moduladors, a més de $p21^{Waf1/Cip1}$, que inhibeixin el creixement tumoral. No sembla que $p27^{Kip1}$, tot i la seva similitud amb $p21^{Waf1/Cip1}$, estigui relacionada amb ella, pels resultats obtinguts. En canvi, en altres 12 casos amb una fase S baixa, $p21^{Waf1/Cip1}$ s'expressà amb nivells elevats, suggerint la necessitat de més $p21^{Waf1/Cip1}$ per poder controlar el creixement tumoral, cosa que semblaria que aconseguix. En canvi, els tumors amb fase S elevada mostraren nivells de $p21^{Waf1/Cip1}$ baixos en 14 casos, la qual cosa pot significar que $p21^{Waf1/Cip1}$ sigui incapaç de respondre enfront de la proliferació cel.lular o que la seva expressió pugui ser inhibida per algun factor relacionat amb la tumoració, la qual cosa permetria el creixement descontrolat de la neoplàsia. En els 9 casos restants, $p21^{Waf1/Cip1}$ es sobreexpressà amb una fase S elevada. Això significaria que aquest grup de tumors podria proliferar tot i la presència de $p21^{Waf1/Cip1}$. S'ha suggerit que en aquests casos, $p21^{Waf1/Cip1}$ podria combinar-se directament i bàsicament amb l'antigen nuclear de proliferació cel.lular (PCNA) o altres proteïnes que puguin induir proliferació cel.lular sense formar el complex quaternari normal amb la ciclina, la CKI i el PCNA. Això comportaria la disminució de la raó de la unió $p21^{Waf1/Cip1}$ /complex ciclina-cdk, i així el complex ciclina-cdk restaria lliure. Per tant, aquestes cèl.lules podrien continuar les diverses etapes del cicle cel.lular i proliferar ³⁹⁶.

També s'ha observat una associació quasi significativa entre la ploidia cel.lular i l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$. Una associació significativa entre ploidia i $p21^{Waf1/Cip1}$ ha estat reportada a la literatura ³⁹⁶. No obstant, la troballa més interessant en quant a $p21^{Waf1/Cip1}$ i la ploidia cel.lular ha estat la tendència a l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ en una major proporció de tumors aneuploides, si ho comparem amb els diploides. Aquesta troballa podria ser explicada pel fet que $p21^{Waf1/Cip1}$ també intervé en el punt de control regulador del cycle cel.lular situat a G_2/M ¹⁸³ i s'associa a l'exhauriment de proteïnes controladores de la mitosi ¹⁹², com ja s'ha comentat a la introducció. Una regulació deficient en aquestos punts podria afectar la replicació de l'ADN i induir l'aparició d'aneuploidia.

Una altra dada interessant, malgrat que no s'obtingueren diferències significatives, possiblement pel escàs nombre de tumors aneuploides d'aquest estudi, fou que tots els tumors aneuploides que mostraren un alt índex proliferatiu presentaren en tots els casos una expressió elevada de $p21^{Waf1/Cip1}$, contrastant amb els tumors amb un baix índex proliferatiu, els quals presentaren una expressió variable de $p21^{Waf1/Cip1}$. Al melanoma maligne l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ i la proliferació cel.lular es troben íntimament relacionades ³⁹⁷, mentre que en els carcinomes de cèl.lules escamoses de la laringe ³⁹⁸, la fase S global i $p21^{Waf1/Cip1}$ no estarien correlacionades. En el càncer de mama, $p21^{Waf1/Cip1}$ es relaciona amb una proliferació elevada de cèl.lules canceroses ³¹³. Per tant, les alteracions en el cycle cel.lular podrien fer que alguns tipus tumorals no responguessin a l'efecte inhibidor de $p21^{Waf1/Cip1}$ o, si no, la proteïna $p21^{Waf1/Cip1}$ anormal seria incapaç de controlar la proliferació cel.lular. Dins de la cèl.lula, $p21^{Waf1/Cip1}$ existeix com un complex proteic juntament amb PCNA, ciclina i cdk. La regulació positiva de $p21^{Waf1/Cip1}$ en cèl.lules proliferatives podria estar relacionada amb alteracions estequiomètriques de la unió de $p21^{Waf1/Cip1}$ en aquest complex quaternari. L'estequiometria alterada pot succeir com a resultat de nivells de ciclina incrementats en cèl.lules proliferatives. Així, $p21^{Waf1/Cip1}$ estaria relacionat amb l'expressió de ciclina A i D en que el 68 i el 70 % dels tumors foren positius per aquestes darreres proteïnes respectivament.

En resum, s'ha observat que la sobreexpressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ succeeix en un nombre significatiu de casos i quasi correlaciona amb un grau alt i l'afectació del marge de resecció, essent també destacable la seva associació amb l'administració de tractament previ.

B.4. COINCIDÈNCIA EN ELS PATRONS D'EXPRESSIÓ DE p53, Bcl-2 I p21^{Waf1/Cip1}

Els resultats obtinguts a partir de la interpretació dels diferents patrons d'expressió de p53, Bcl-2 i $p21^{Waf1/Cip1}$ ens porten a pensar en l'existència de complexos mecanismes de regulació d'aquests moduladors entre sí.

b.4.1) p53- p21^{Waf1/Cip1}

Un altre punt important d'aquesta discussió fou l'anàlisi de la relació entre p53 i $p21^{Waf1/Cip1}$. En aquest treball no s'ha trobat una associació significativa entre ambdós moduladors, fet observat en estudis previs ²⁷⁸. Malgrat tot, en un altre estudi s'ha publicat que existia aquesta associació significativa ²⁷⁹. Els resultats obtinguts mostren 16 casos (35 %) de fenotipus p53 + / $p21^{Waf1/Cip1}$ -, que pot correspondre a la situació en la qual p53 es sobreexpressaria però faltaria activitat transcripcional degut a inactivació mutacional o funcional. Igualment, el fenotipus p53 - / $p21^{Waf1/Cip1}$ +, que s'observa en 7 casos (15 %), podria ser explicat a l'assumir que $p21^{Waf1/Cip1}$ podria estar activat per la p53 nativa, la qual cosa correspon a baixos nivells immunohistoquímics de p53 i indueix la cèl.lular a aturar el cicle cel.lular i l'apoptosi. 11 casos (24 %) de fenotipus p53 - / $p21^{Waf1/Cip1}$ - poden correspondre a una situació de normalitat, sense cap alteració en la via reguladora p53- $p21^{Waf1/Cip1}$, o a una hipotètica situació en que p53 es trobaria mutada i s'aboliria el seu producte gènic. Sorprenentment, hi han 12 casos (26 %), amb un fenotip p53+ / $p21^{Waf1/Cip1}$ +. Una possibilitat que darrerament ha cobrat força interès i que expliqui aquest resultat seria que la proteïna

$p21^{Waf1/Cip1}$ fos induïda per un mecanisme $p53$ -independent, per exemple, mitjançant el $TGF-\beta$ ³⁹⁹. De fet, vies independents de $p53$ han estat proposades per altres tumors com la mama^{313, 400, 401}.

Per entendre tot això cal recordar que un dels gens coneguts que és regulat per $TGF-\beta_1$ és $p21^{Waf1/Cip1}$. Elevacions dels nivells de $p21^{Waf1/Cip1}$ induïts per $TGF-\beta_1$ inhibeixen el pas de les cèl.lules de G_1 a S al cicle cel.lular, per la qual cosa restringeixen la proliferació cel.lular. Aquest sistema s'ha observat que roman intacte a les cèl.lules prostàtiques humanes, on es pensa que media els efectes negatius del creixement de $TGF-\beta_1$ aturant les cèl.lules a G_1 i dirigint-les cap a una via apoptòtica⁴⁰².

L'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ sembla correlacionar-se amb la diferenciació terminal de múltiples línees cel.lulars i sembla estar d'acord amb la proposta que contribueix a la sortida del cicle cel.lular i a la diferenciació durant el desenvolupament. Recentment, s'ha proposat que, a més de jugar un paper positiu en el compromís per diferenciar-se, l'expressió disminuïda de $p21^{Waf1/Cip1}$ és necessària per a la diferenciació terminal⁴⁰³. Així, el $TGF-\beta_1$ expressat transitòriament per les cèl.lules musculars llises de la pròstata en fase de desenvolupament actua com a factor paracrí, el qual indueix transitòriament l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ a les cèl.lules epitelials adjacents. En actuar d'aquesta manera, $TGF-\beta_1$ juga un paper a l'estimular l'entrada de les cèl.lules epitelials cap a una via de diferenciació. La subseqüent disminució de la $p21^{Waf1/Cip1}$ epitelial, potser relacionada amb la disminució de $TGF-\beta_1$ de les cèl.lules musculars llises, podria permetre finalment la diferenciació terminal de l'epiteli prostàtic. La seqüència d'aquests esdeveniments podria normalment succeir durant una període de "finestra" discret d'oportunitat, i una interrupció d'aquests aconteixements podria donar lloc a defectes en el desenvolupament permanents de la glàndula prostàtica.

b.4.2) p53 - Bcl-2

S'ha suggerit que p53 podria estar implicada en la regulació de Bcl-2, particularment en estadis avançats de la malaltia ³⁵⁴, malgrat que tant en aquesta tesi com en la major part d'estudis previs sobre aquest tema no s'hagi trobat una associació significativa ^{278, 336, 353, 404}. Es possible que aquesta regulació sigui indirecta, ja que alguns estudis han trobat que p53 regula Bax a nivell transcripcional i s'ha demostrat que Bax accelera la tumorigènesi en ratolins amb deficiència de p53 ⁴⁰⁵.

Donat que p53 estimula l'apoptosi i Bcl-2 la inhibeix, hom pot pensar que p53, d'alguna manera, redueix l'expressió de Bcl-2. De tota manera, no hem trobat una associació significativa entre ambdós moduladors. En 16 casos no hem trobat expressió de cap dels dos marcadors. Això ens fa pensar que aquest grup estaria format per tumors de comportament poc agressiu, on nivells mínims de p53 nativa, no detectada mitjançant tècniques immunohistoquímiques, serien suficients per inhibir Bcl-2. No obstant, la situació més freqüent ha estat l'expressió de p53 amb negativitat de Bcl-2, gairebé en el 50% dels casos. En aquesta situació, hom pot pensar en un grup de tumors de comportament una mica més agressiu que en grup anterior, on seria necessari augmentar els nivells de p53 nativa per continuar inhibint Bcl-2. Una altra possibilitat és que aquesta p53 expressada fos mutada i també sigui capaç de negativitzar Bcl-2, possibilitat més remota donat l'escàs nombre de mutacions de p53 detectades a la nostra mostra.

Finalment, trobem dues situacions que s'han donat en un petit nombre de casos. En primer lloc, s'han observat 5 casos p53 + / Bcl-2 + . En aquest cas, que sigui p53 la mutada i no pugui negativitzar Bcl-2 per la seva incapacitat funcional. També podem pensar, encara que es consideri poc probable, que tot i augmentar els nivells de p53, aquesta sigui incapaç de negativitzar Bcl-2, possiblement perquè Bcl-2 es trobi mutada. En segon lloc, trobem dos casos p53 - / Bcl-2 + , que plantegen una situació que va en contra de la nostra hipòtesi inicial. L'explicació més plausible, en aquest cas, és que p53 sigui normal i que l'expressió de Bcl-2 estigui alterada per mecanismes

independents de p53 o que almenys p53 estigui mutada i no hagi estat detectada per immunohistoquímica.

De tot això, cal pensar que el grup amb millor pronòstic podria ser p53 - / Bcl-2 - i el de pitjor pronòstic p53 + / Bcl-2 + . Altres autors ja fa temps que han demostrat, inicialment en altres tipus de neoplàsies, que l'expressió simultània de p53 i Bcl-2 s'associava amb un pitjor pronòstic respecte als casos amb acumulació únicament de p53⁴⁰⁶. Posteriorment, diversos estudis utilitzant mostres de càncer de pròstata amb llargs períodes de supervivència han corroborat aquesta idea, observant que p53 - / Bcl-2 - era el grup amb una supervivència més llarga i p53 + / Bcl-2 + era el grup de pitjor supervivència^{337, 364}. La possibilitat que sigui Bcl-2 la que reguli p53 es considera improbable, donades les funcions que es coneixen en l'actualitat d'aquests dos reguladors.

La focal observació d'expressió de p53 observada a la PIN, tal com s'ha descrit prèviament, podria ser un reflex de l'intent de resposta fisiològica que intentaria compensar, almenys inicialment, aquesta sobreexpressió de Bcl-2. Tanmateix, això no explicaria la pèrdua d'expressió de Bcl-2 al carcinoma invasiu amb el manteniment de l'expressió de p53, almenys en alguns casos, la qual cosa ens fa pensar en uns mecanismes de regulació molt més complexos, amb participació d'altres moduladors i amb l'aparició de mutacions que afectarien l'expressió de Bcl-2 i no de p53.

b.4.3) p21^{Waf1/Cip1} - Bcl-2

Un altre resultat interessant va ser que l'augment de l'expressió de Bcl-2 es relacionava amb concentracions elevades de p21^{Waf1/Cip1} en tots els casos. No obstant, la possible relació entre aquests dos moduladors roman poc clara, ja que hem trobat freqüentment que p21^{Waf1/Cip1} s'expressava amb nivells alts i Bcl-2 era negativa. A més, l'associació significativa es perdia quan s'estudiaven aquestes dues variables en funció del marge de resecció i del grau de Gleason. Això ens fa pensar en un possible factor de confusió, per la qual cosa tant p21^{Waf1/Cip1} com Bcl-2 no es trobaven directament associades,

sinó mitjançant altres variables com el grau tumoral, donada la seva associació significativa o quasi significativa amb $p21^{Waf1/Cip1}$ i amb Bcl-2.

Tanmateix, no es descarta que pugui existir una via reguladora específica en la qual Bcl-2 afavoriria l'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$. Així, existeixen estudis que han intentat definir aquesta relació^{389, 407} i d'altres que no han mostrat relació entre ambdós²⁷⁸. Altres treballs també proposen un paper regulador dels andrògens en aquesta hipotètica via reguladora⁴⁰⁷, que ajudarien Bcl-2 a fomentar la sobreexpressió de $p21^{Waf1/Cip1}$. Això podria explicar, considerant l'escàs nombre de casos Bcl-2 +, perquè el percentatge de cèl.lules tumorals $p21^{Waf1/Cip1}$ + ha estat relativament baix, en comparació amb diverses publicacions sobre el tema.

C. $p27^{Kip1}$

Diversos estudis han augmentat l'interès en l'anàlisi de les anomalies d'inhibidors del cicle cel.lular com a aconexions clau a la carcinogènesi. Entre ells, la inhibició de $p27^{Kip1}$ ha estat proposada com un esdeveniment important, la determinació de la qual pot tenir un important valor pronòstic, o pot ser útil pel diagnòstic diferencial de diversos models tumorals. Cal remarcar que aquesta inhibició progressa des de lesions preinvasives fins als estadis invasius i metastàsics al carcinoma de mama⁴⁰⁸.

Malauradament, l'alta incidència del CP no s'associa a informació dels mecanismes moleculars que es produeixen un cop ha esdevingut la transformació maligna i la progressió del model. Anàlisis de sèries limitades de CPs suggereixen que les alteracions genòmiques en $p27^{Kip1}$ com són les mutacions puntuals, reordenaments i delecions són poc probables^{409, 410}.

Els nostres resultats clarament mostren que la proteïna $p27^{Kip1}$ s'expressa àmpliament en glàndules normals prostàtiques a més d'en lesions benignes com la hiperplàsia nodular i la metaplàsia transicional, suggerint un fenomen constitutiu que podria estar implicat en la modulació del recanvi

epitelial prostàtic. De tota manera, a partir dels resultats obtinguts es pot postular que els nivells de p27^{Kip1} en teixit prostàtic normal podrien anar disminuint amb l'edat, i potser l'edat podria ser una variable de confusió que pugués influir i explicar parcialment la disminució de l'expressió de p27^{Kip1} que succeeix a la PIN i als tumors invasius.

Alguns autors han observat una pèrdua de p27^{Kip1} a la Hiperplàsia Benigna Prostàtica (HBP), fet que no hem trobat al nostre estudi. Possiblement, la disminució dels nivells de p27^{Kip1} postulada a la HBP seria deguda a mecanismes diferents als que succeeixen en el càncer de pròstata, donat que no s'ha evidenciat regulació de p27^{Kip1} a nivell posttranscripcional a l'HBP¹⁹⁵.

També es manté l'expressió de p27^{Kip1} a glàndules atròfiques. Es considera que a les glàndules atròfiques hi ha un augment de la degradació proteica mitjançant la via de la ubiquitina-proteasoma. Per tant, p27^{Kip1} hauria de disminuir a les glàndules atròfiques. És possible que existeixi algun tipus de mecanisme regulador selectiu al proteasoma, per tal d'eliminar algunes proteïnes, l'absència de les quals produeixi atrofia glandular. Un altra explicació podria ser que, malgrat l'augment de proteïnes per ser degradades, no augmenti excessivament la funció d'aquesta via eliminadora de proteïnes i, per tant, es produeixi una inhibició de tipus competitiu de la degradació de p27^{Kip1} per part d'altres proteïnes, les quals habitualment no s'eliminarien amb tanta quantitat.

Aquesta expressió disminueix durant els primers passos de la transformació maligna i p27^{Kip1} és regulat negativament quan la neoplàsia intraepitelial d'alt grau es desenvolupa.

Aquesta inhibició és manté o s'accentua quan la neoplàsia arriba a l'estadi invasiu i l'expressió de p27^{Kip1} és freqüentment mínima en cèl·lules metastàsiques. Si aquesta inhibició està directament implicada en la progressió tumoral o és només un epifenomen, no pot determinar-se amb els nostres resultats. S'ha observat que nivells elevats de p27^{Kip1} poden servir com a

barrera per la progressió de la cèl.lular a la fase S i pot tenir la funció de senyal de sortida del cicle cel.lular ⁴¹¹. Experiments "in vitro" han demostrat que els nivells de p27^{Kip1} són elevats a les cèl.lules quiescents. En resposta a estímuls mitogènics, aquestos nivells cauen i romanen baixos a les cèl.lules proliferatives. L'eliminació dels estímuls mitogènics eleva de nou els nivells de p27^{Kip1}. Diversos estudis que tracten sobre línees de CP han demostrat la inhibició mediada per oligonucleòtids "antisense", que augmenta la proliferació i redueix l'adhesió intercel.lular ⁴¹². Els resultats obtinguts mostren una disminució dels nivells de p27^{Kip1} en augmentar la fase S, sense ser aquest augment significatiu. Les anàlisis en carcinomes colònics i de mama tampoc han trobat una associació entre la inhibició de p27^{Kip1} i l'augment de la proliferació ^{199, 408, 413}, mentre que aquesta associació si ha estat reportada en tumors endocrins i limfomes ^{414, 415}. Tot i què un possible impacte de la inhibició de p27^{Kip1} en la proliferació tumoral al CP encara necessita ser tractada específicament, es pot postular que aquesta expressió reduïda no només es troba implicada en una modulació del cicle cel.lular empitjorada mitjançant l'activitat inhibidora de les CDK, sinó també en la invasió per cèl.lules tumorals, facilitant el despegament de cèl.lules individuals. Compatible amb aquesta hipòtesi, com ja s'ha esmentat, hem observat que l'expressió de p27^{Kip1} és sovint més baixa en cèl.lules invasives que en cèl.lules neoplàsiques intraglandulars de la PIN, i que és freqüentment mínima o absent als nius tumorals metastàsics. A més, s'ha proposat que la n-cadherina es trobaria implicada en la inhibició per contacte del creixement induint l'aturada del cicle cel.lular a la fase G1 i l'elevació dels nivells de p27^{Kip1} ⁴¹⁶. Un altre efecte proposat "in vitro" de la inhibició de p27^{Kip1} és la sensibilització contra alguns agents quimioterapèutics. Aquesta possibilitat caldria que fos confirmada mitjançant estudis addicionals "in vivo", donades les seves implicacions terapèutiques. De tota manera, en els casos de la nostra sèrie que van rebre tractament previ, els nivells de p27^{Kip1} no mostraren diferències amb el grup no tractat, suggerint que el tractament previ no influiria a nivell posttranscripcional en els malalts tractats abans de la cirurgia.

En canvi, si que hem trobat associació significativa entre la disminució de l'expressió de p27^{Kip1} i un alt grau histològic. Altres estudis

realitzats amb mostres de càncer de pròstata també han evidenciat relació amb el grau tumoral ^{281, 319, 320, 322, 417}, malgrat que en dos estudis no s'observà aquesta associació ^{195, 418}. A més, la sobreexpressió de p27^{Kip1} s'ha correlacionat amb un baix grau tumoral, en altres models tumorals, com a la mama i colon ^{408, 419}.

Tal com s'ha evidenciat en altres estudis, hem observat absència d'associació significativa pel que fa a l'estadi tumoral ^{195, 281, 320, 417, 418}, edat ^{320, 420}, invasió ganglionar ⁴²⁰ i PSA preoperatori ^{281, 319, 320, 322, 420}. A diferència dels nostres resultats, en altres estudis s'ha reportat una associació significativa amb l'estadi tumoral ³²², l'afectació del marge de resecció ^{319, 420}, la invasió de les vesícules seminals ^{319, 420}, la invasió ganglionar ³¹⁹, la recidiva del PSA ²⁸¹, la ploidia cel.lular ³¹⁹ i la proliferació ¹⁹⁶.

En la nostra sèrie, un petit percentatge de tumors mostrà una expressió alta de p27^{Kip1}, generalment similar a la del teixit normal. L'existència de tumors amb aquesta expressió intensa, que coincidí amb la de lesions de PIN amb baixa expressió de p27^{Kip1}, suggereix que una estimulació "tardana" d'aquest modulador és possible durant la progressió neoplàsica.

Malgrat pertànyer a la mateixa família de CKIs i existir fins a 14 casos amb una alteració de p21^{Waf1/Cip1} i p27^{Kip1} de forma simultània, no hem trobat cap associació significativa entre ambdós moduladors. Aquesta associació ha estat estudiada per altres autors amb resultats no conclouents ²⁷⁶. Donat que p21^{Waf1/Cip1} és regulat transcripcionalment per p53 i altres moduladors, i p27^{Kip1} és regulat a nivell posttranscripcional, és probable que la seva regulació estigui modulada per vies independents.

D. CATEPSINES

Un dels aconteixements més importants durant el desenvolupament i la progressió tumoral és la invasió local mitjançant la degradació de components de la matriu extracel.lular, i un nombre creixent de proteases i els

seus inhibidors estan implicats en aquest procés. Entre els primers, les cisteín proteases sembla que estan sintetitzades per diversos tipus de neoplàsies malignes humanes. S'ha demostrat prèviament que la catepsina B es troba freqüentment expressada per carcinomes de colon i que aquesta expressió es correlaciona amb l'estadi tumoral i la supervivència dels malalts ²⁵². La mama, el pulmó, la laringe i altres tipus de neoplàsies malignes poden produir aquesta i altres catepsines, i aquesta producció podria tenir importants implicacions pronòstiques ^{247, 249, 253, 421, 422}. En aquest estudi hem observat que dos tipus de catepsines, B i S, es troben presents amb freqüència en les cèl·lules prostàtiques malignes, tant en estadis preinvasius com en invasius, i que aquesta expressió ocorre concomitantment.

D.1. EXPRESSIÓ DE CATEPSINES B I S

L'expressió més intensa d'ambdues molècules es va trobar, tal com s'esperava, als macròfags de les llums glandulars normals i a l'estroma dels focus inflamatoris, més probablement relacionat amb el processament i la presentació d'antígens ^{256, 257, 423-425}.

La presència de la Catepsina B (Cat B) i la Catepsina S (Cat S) a l'epiteli de glàndules inflamades suggereix un paper actiu d'aquestes cèl·lules en el processament d'altres enzims i proteïnes activats durant el procés inflamatori. L'expressió forta concomitant s'ha observat en glàndules amb metaplàsia transicional, per tant cèl·lules de tipus urotelial. L'expressió de la Cat B s'ha reportat a l'epiteli normal i al carcinoma de bufeta ⁴²², suggerint que aquesta proteasa podria ser expressada constitucionalment per cèl·lules amb aquest fenotip. Encara que, pel nostre coneixement, no es disposa d'informació respecte a l'expressió de la Cat S a l'uroteli, una explicació similar podria ser certa per aquesta altra catepsina.

En contrast amb la Cat S, s'ha observat una immunopositivitat intensa per la Cat B a l'epiteli atròfic, el significat de la qual no és clar. Les catepsines produïrien la degradació de diverses proteïnes que tenen un paper

important en el desenvolupament de l'atròfia i, per tant, estaria justificada la seva expressió a les glàndules atròfiques. És possible que la Cat B pugui estar implicada en l'apoptosi o en la remodelació de la membrana basal de glàndules que pateixen canvis en la mida o tensió luminal^{289, 426-428}. D'altra banda, no queda clar perquè no s'expressa la Cat S en glàndules atròfiques. Es sap que aquesta catepsina té una activitat elastolítica i és capaç de degradar diversos components de la matriu extracel.lular a un pH neutre²⁵⁵.

De manera similar, la Cat B s'expressa intensament en cèl.lules basals de glàndules prostàtiques normals, que podrien estar relacionades amb el recanvi de la membrana basal o amb altres interaccions cèl.lula-matriu extracel.lular. La intensa expressió de la Cat S en cèl.lules esporàdiques de glàndules normals aïllades, la distribució topogràfica de les quals suggereix una naturalesa neuroendocrina és digna d'una menció especial⁴²⁹. A més de la intensitat, la distribució difusa de la positivitats en aquestes cèl.lules contrasta àmpliament amb l'expressió granular grollera a la majoria de carcinomes, suggerint un diferent processament citoplasmàtic i/o funció a l'epiteli normal i neoplàsic.

Estudis previs han mostrat expressió de Cat B en proliferacions premalignes humanes (displàsia) en òrgans com la bufeta i el colon^{422, 430}. La presència freqüent de Cat B i Cat S als CP i les seves lesions premalignes suggereixen un paper important en les etapes inicials i en la progressió d'aquest tipus de neoplàsia. Tot i que la funció exacta d'aquests enzims en la progressió tumoral no s'ha establert definitivament a partir dels nostres resultats, postulem que, de manera similar a la Cat D i les colagenases^{431, 432}, l'expressió de Cat B i Cat S a la PIN d'alt grau pot estar relacionada amb el remodelament directe de la matriu extracel.lular adjacent previ a la invasió estromal o a l'afectació del processament citoplasmàtic d'altres proteases o proteïnes relacionades amb aquest procés. L'existència de molts casos de carcinoma negatiu per a Cat B amb PIN associada que expressa aquesta proteasa accentua encara més la possibilitat de funcions específiques de la Cat B a les primeres etapes de la transformació maligna de la pròstata, que es podria perdre durant la progressió tumoral en alguns casos. Funcions similars a

les proposades per a la PIN d'alt grau es poden suggerir donada l'expressió d'aquestes proteases en carcinomes invasius, essent tot el contrari a les neoplàsies de colon i bufeta ^{252, 422}, aquesta expressió no va ser específicament significativa a les vores invasives del tumor. Una altra diferència amb els models tumorals esmentats anteriorment és que, encara que alguns macròfags que expressen totes dues catepsines foren observats entre algunes glàndules neoplàsiques, no es detectà una presència significativa d'aquestes cèl·lules a l'estroma de glàndules malignes adjacents, la qual cosa podria estar relacionada amb l'escàs infiltrat histiocític estromal del CP. Un estudi previ ha demostrat l'expressió de Cat B als CP, en els quals s'ha proposat un paper a l'angiogènesi i la invasió estromal ^{290, 291, 433}.

Pel que fa a la Cat S, fins ara no s'havia publicat cap estudi sobre el paper d'aquesta catepsina en el CP. El nostre estudi immunohistoquímic ha permès una avaluació acurada de l'expressió citoplasmàtica d'ambdues catepsines, les quals mostren diferents patrons de positivitat. Així, la Cat B fou bàsicament difusa, mentre que la Cat S semblava reflexar una distribució en forma de grànuls citoplasmàtics grollers, de vegades amb una localització predominant cap a la llum que podria indicar una funció secretora. Diferències en el seu paper podrien explicar les troballes abans esmentades i l'observació d'una tinció difusa i no granular de Cat B al carcinoma colo-rectal i de bufeta ha estat interpretat prèviament com una forma truncada de la proteïna que es troba lliure al citosol o s'associa a la membrana amb una capacitat degradant de la matriu extracel·lular augmentada ^{244, 422}.

D.2. COEXPRESSIÓ DE CATEPSINES B I S

Entre les troballes principals del nostre estudi s'ha vist l'elevada freqüència de expressió concomitant de Cat B i Cat S, que arriba al 63% dels casos. En la mama ^{247, 421}, cap i coll ^{253, 434, 435}, melanoma ⁴³⁶ i altres tipus de tumors malignes humans s'ha demostrat que expressen molts tipus de catepsines i les seves inhibidores, les estefines, amb implicacions pronòstiques diferents. Pel que coneixem, el nostre estudi és el primer cop que reporta l'expressió concomitant de Cat B i Cat S a la progressió inicial d'un tumor

humà. Aquesta coexpressió, també observada en fases preinvasives de l'epiteli prostàtic transformat en la nostra sèrie de casos, podria indicar un paper col·laborador en el desenvolupament de les neoplàsies prostàtiques.

Tanmateix, la interpretació d'aquesta coexpressió és complexa. S'evidencià una tendència a disminuir la Cat B a tumors d'alt grau i amb l'edat. En canvi, la Cat S sembla mostrar una tendència a expressar-se a tumors de comportament més agressiu. Davant d'això, podem pensar en l'existència de mecanismes, encara no ben aclarats, que possiblement actuarien als lisosomes, afavorint posteriorment l'expressió d'ambdues catepsines alhora, encara que un cop activades, la seva funció seria diferent en alguns aspectes. Així, la Cat B podria ser protectora contra el carcinoma, afavorint l'apoptosi; en canvi, la Cat S afavoriria la invasió tumoral potser per les seves propietats elastolítiques, que permetrien la degradació de la matriu extracel·lular juntament amb altres enzims.

Per estudiar més detalladament el paper d'aquestes proteases en estadis tardans de la progressió del CP, calen noves i detallades anàlisis immunohistoquímiques a metàstasis, encara que la dificultat per obtenir aquest material, usualment no biopsiat, impedeix aquesta valoració.

D.3. ASSOCIACIÓ ENTRE CATEPSINA B I BCL-2

Una de les troballes més interessants del nostre estudi fou l'aparició d'expressió de Cat B en tumors Bcl-2 -, que mostrà una relació significativa. En canvi, aquesta troballa no s'observà amb la Cat S. Aquest fet suggereix que la Cat B podria intervenir en la regulació d'alguna via apoptòtica a les cèl·lules tumorals. No obstant, és sorprenent que la relació entre tots dos marcadors sigui inversa, ja que caldria suposar inicialment que la Cat B s'hauria d'expressar en tumors Bcl-2 + de comportament suposadament més agressiu.

En contra del paper directe de la Cat B a la regulació de l'apoptosi, inicialment es va postular que la funció de la Cat B podria estar relacionada

senzillament amb la necessitat d'eliminació de les cèl.lules apoptòtiques, la qual cosa pot suposar que la Cat B s'expressés en tumors, les cèl.lules del quals mostrarien un fenotipus menys agressiu i podrien ser eliminades en quantitats destacables per apoptosi.

De tota manera aquesta hipòtesi es considera actualment poc probable, donat que el paper de la Cat B a l'apoptosi ha estat recentment estudiat utilitzant cultius d'hepatòcits tractats amb $TNF-\alpha$, obtinguts de ratolins "knock-out" per Cat B⁴³⁷. S'ha trobat que quan es comparaven els ratolins Cat B -/- amb ratolins Cat B +/- l'apoptosi disminuïa, a més d'augmentar la seva supervivència, suggerint que no es tractava tan sols d'un epifenomen. Experiments addicionals detectaren l'alliberament de citocrom c i l'activació de les caspases 3 i 9 en les cèl.lules Cat B -/-. Per ratificar-ho, s'ha analitzat l'alliberament de citocrom c a partir de mitocondris purificats i s'ha observat que, tot i l'alliberament de citocrom c induït per la Cat B, aquest alliberament va augmentar marcadament al citosol, suggerint que una o varies dianes de la Cat B en podrien ser les responsables⁴³⁷.

Altres autors han reportat troballes a favor d'un paper actiu de la Cat B a la regulació de l'apoptosi, malgrat la majoria de treballs han estudiat la via dels receptors letals i no directament Bcl-2: s'ha observat que les caspases 2 i 8 activades poden alliberar Cat B de lisosomes purificats⁴³⁷. A més, hi han evidències que suggereixen que durant l'apoptosi, es produeix l'estimulació de la transcripció de ARNm per sintetitzar Cat B, la seva traducció a proteïna i, finalment, la translocació d'aquesta proteïna al citoplasma. Donat que el citoplasma és el lloc on succeeixen diverses vies executadores de l'apoptosi, això ens fa pensar que la Cat B podria interaccionar amb altres mecanismes reguladors afavorint la progressió el procés apoptòtic, fet que podria suposar un paper regulador negatiu de Bcl-2. Un altre fet comprovat en estudis experimentals realitzats en ratolins és que la inhibició dels nivells d'andrògens produeix l'apoptosi massiva de les cèl.lules prostàtiques³⁷³. Davant això, cal plantejar-se si els andrògens podrien influir en l'augment dels nivells de Cat B al càncer de pròstata.

Per finalitzar, la relació entre la sobreexpressió de la Cat B i un comportament tumoral més agressiu, tal com s'ha observat en diversos models tumorals^{252, 253}; amb els resultats obtinguts en el nostre treball, sembla que no dependria directament d'alteracions en l'apoptosi de les cèl·lules tumorals, sinó d'altres mecanismes, com pot ser, per exemple, la degradació de la matriu extracel·lular.

D.4. RELACIÓ ENTRE CATEPSINA S I P53

La funció de la Cat S presenta algunes característiques diferenciades de la Cat B, com les seves propietats elastolítiques. En l'expressió de la Cat S podria ser necessària la intervenció de p53, ja que s'ha observat que en els casos amb absència d'expressió de Cat S, p53 es troba sobreexpressada. Tanmateix, en la regulació de la funció de la Cat S hi intervendrien altres factors amb tota seguretat, com evidència el fet d'haver trobat molts casos amb p53 alterada que sobreexpressaren Cat S.

Malgrat això, amb les dades obtingudes en el nostre estudi, no és descartable que aquesta relació es tracti senzillament d'un epifenomen. A més, no es disposa de cap treball científic que estudiï la relació entre aquests dos moduladors i que servís per ajudar a explicar el significat de les nostres troballes.

E. CONSIDERACIONS FINALS

Dels resultats obtinguts en aquest treball es pot deduir globalment que els mecanismes de regulació del cicle cel·lular i de l'apoptosi, així com els mecanismes d'invasió tumoral, almenys alguns dels coneguts fins a l'actualitat, es troben freqüentment alterats al CP, estant afectats agents inhibidors de la proliferació com p21^{Waf1/Cip1} i p27^{Kip1}, moduladors inhibidors de l'apoptosi com Bcl-2, estimuladors de l'apoptosi com p53 i enzims degradants de la matriu extracel·lular com les catepsines. Aquestes anomalies, que amb freqüència coincideixen en un mateix tumor, es poden detectar en molts casos en fases

inicials de la neoplàsia, per la qual cosa probablement tinguin un paper important en la progressió i expressin la gran complexitat de la regulació del creixement d'aquests tumors. A la figura 38 s'intenta esquematitzar els diferents fenotips predominants al teixit prostàtic normal, preneoplàsic i neoplàsic en funció dels marcadors estudiats.

L'avaluació de la utilitat pràctica dels estudis immunohistoquímics desenvolupats en aquest treball requerirà estudis posteriors, en els quals s'avaluin sèries àmplies de casos seleccionats amb criteris d'homogeneïtat clínicopatològica i seguiments perllongats, i estudis utilitzant tècniques de biologia molecular, particularment tècniques de genòmica i proteòmica, que ens permetin conèixer millor les alteracions genètiques d'aquests tumors per tal de poder predir el comportament d'aquestes neoplàsies, així com definir models terapèutics més acurats i adequats que els actuals.

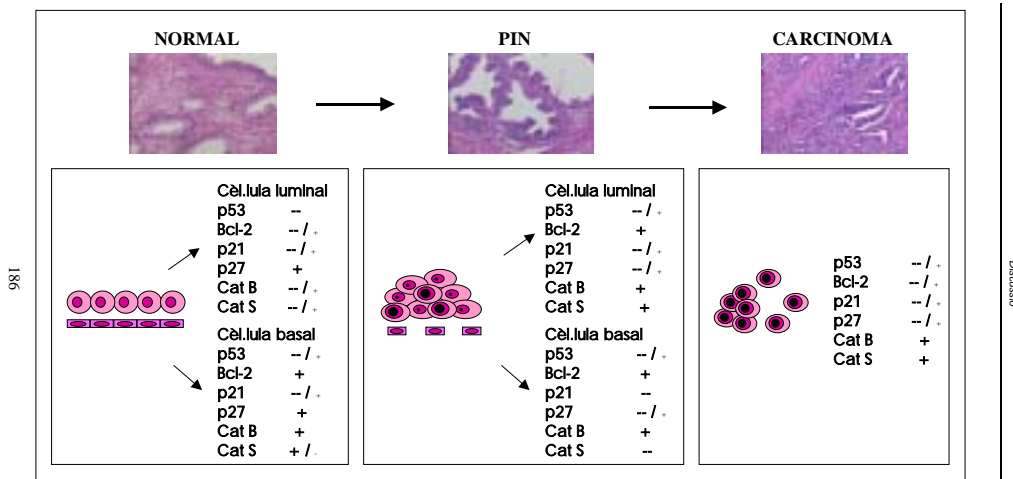


Fig. 38. Resum dels fenotips dels diferents compartiments cel.lulars en la progressió neoplàstica.

Els símbols + i - únicament pretenen expressar en un sentit abstracte el fenotip més freqüent de cadascun dels tipus cel.lulars comentats.

VI. CONCLUSIONS

1.- La sobreexpressió del gen TP53 al model de neoplàsia prostàtica s'ha trobat predominantment a la fase de carcinoma, la qual cosa recolza la hipòtesi que l'expressió del gen TP53 mutat succeeix en etapes tardanes de la carcinogènesi de la glàndula prostàtica. L'associació de la sobreexpressió del p53 amb certs paràmetres clínicopatològics, com el marge de resecció positiu i la fase S, probablement es deu a la seva associació amb el grau histològic.

2.- La freqüent sobreexpressió del gen bcl-2 observada a la Neoplàsia Prostàtica Intraepitelial d'alt grau suggereix un paper d'aquest gen antiapoptòtic a la tumorigènesi prostàtica inicial, on podria actuar com a factor de supervivència per contrarrestar un possible augment de l'apoptosi a lesions premalignes i permetent la progressió tumoral.

3.- La sobreexpressió aberrant del gen $p21^{Waf1/Cip1}$ en les cèl·lules tumorals caracteritza un subgrup de pacients amb un curs clínic desfavorable, la qual cosa es podria deure a la seva associació amb el grau histològic. La regulació del punt de restricció fisiològica G_1/S del cicle cel·lular podria estar alterat amb participació de mecanismes d'activació de $p21^{Waf1/Cip1}$ independents de p53. D'altra banda, la mancança d'expressió de $p21^{Waf1/Cip1}$ no sembla tenir un paper rellevant al no trobar-se associada a altres paràmetres clínicopatològics.

4.- La proteïna $p27^{Kip1}$ es troba expressada intensament a l'epiteli prostàtic normal i hiperplàsic, i la regulació negativa és un fenomen comú al carcinoma de pròstata, succeint a les fases inicials de l'evolució neoplàsica. Donada la capacitat supressora tumoral del gen de $p27^{Kip1}$, la seva expressió disminuïda podria tenir un important paper en el desenvolupament i progressió del càncer de pròstata.

5.- En la carcinogènesi prostàtica es produeixen alteracions, sovint múltiples, que afecten en forma de sobreexpressió de diversos gens supressors com TP53, p21^{Waf1/Cip1} i p27^{Kip1} o gens antiapoptòtics com bcl-2, suggerint la possibilitat d'un efecte col.laboratiu entre ells o la necessitat de progressives alteracions fenotípiques. Això succeeix amb una especial freqüència en tumors de més alt grau histològic i, per tant, de més gran agressivitat biològica.

6.- Tant la Cat B com la Cat S es coexpressen freqüentment als carcinomes de pròstata i aquesta expressió sembla tenir un paper ja en fases de desenvolupament inicial. L'absència d'immunopositivitat comparable al teixit normal suggereix un paper d'aquestes cisteïn proteases en la progressió del carcinoma de pròstata.

7.- La Cat B sovint es sobreexpressa en tumors negatius per a Bcl-2, la qual cosa planteja un possible paper de la Cat B en la regulació d'alguna via apoptòtica a les cèl.lules tumorals.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Foster CS, Cornford P, Forsyth L, Djamgoz MBA, Ke Y. The cellular and molecular basis of prostate carcinoma. *Br J Urol* 1999; 83: 171-194.
2. Hsing AW, Tsao L, Devesa SS. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 2000; 85: 60-67.
3. Hankey BF, Feuer EJ, Clegg LX et al. Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer - Part I: evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality and survival rates. *JNCI* 1999; 91: 1017-1024.
4. Borràs JM, Galcerán J. Cancer Registry of Tarragona. A: Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J, Powell J, ed. *Cancer incidence in five continents, vol VI*. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Scientific Publication; 1992: 722-723.
5. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 8-31.
6. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics 1996. *CA Cancer J Clin* 1996; 46: 5-27.
7. Devesa SS, Silverman DT. Cancer incidence and mortality trends in the United States 1935-1974. *J Natl Cancer Inst* 1978; 60: 545-571.
8. Zubiri A, Cuchí T, Abadía MJ, eds. *Estadística Oncológica de la Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer. Años 1995 y 1996*. Zaragoza.
9. Izquierdo A, Marcos R, Vilardell L, Viladiu P. La incidència del càncer a Catalunya. *Setzè Congrès de Metges i Biòlegs de Llengua Catalana. Llibre de Ponències* 2000; 195-202.
10. Sakr WA, Billis A, Ekman P, Wilt T, Bostwick DG. Epidemiology of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2000; 205: 11-18.
11. Algaba F. Evolution of isolated high-grade prostate intraepithelial neoplasia in a mediterranean patient population. *Eur Urol* 1999; 35: 496-497.
12. Regueiro JC, Moreno P, Leva M et al. Incidencia de la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado en la práctica urológica. *Actas Urol Esp* 2000; 24: 446-451.
13. O'Dowd DJ, Miller MC, Orozco R, Veltri RW. Analysis of repeated biopsy results within 1 year after a non-cancer diagnosis. *Urology* 2000; 55: 553-558.

14. Sakr WA, Grignon DJ. Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia. Relationship to pathological parameters, volume, spatial distribution of carcinoma of the prostate. *Anal Quant Cytol Histol* 1998; 20: 417-423.

15. Orteil H. Involutionary changes in prostate and female breast cancer in relation to cancer development. *Can Med Assoc J* 1926; 16: 237.

16. McNeal JE. Morphogenesis of prostatic carcinoma. *Cancer* 1965; 18: 1659-1666.

17. McNeal JE, Bostwick DG. Intraductal dysplasia: a premalignant lesion of the prostate. *Hum Pathol* 1986; 17: 64-71.

18. Bostwick DG, Brawer MK. Prostate intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer* 1987; 59: 788-794.

19. Bostwick DG. Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). *Urology* 1989; 34 (Suppl 6): 16-22.

20. Montironi R, Mazzucchelli R, Algaba F, López-Beltrán A. Morphological identification of the patterns of prostatic intraepithelial neoplasia and their importance. *J Clin Pathol* 2000; 53: 655-665.

21. Bostwick DG. Prostatic intraepithelial neoplasia is a risk factor for cancer. *Sem Urol Oncol* 1999; 17: 187-198.

22. Bostwick DG, Montironi R, Sesterhenn IA. Diagnosis of prostatic intraepithelial neoplasia: Prostate Working Group / consensus report. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2000; 205: 3-10.

23. Berman DM, Yang J, Epstein JI. Foamy gland high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 140-144.

24. Yang XJ, Lecksell K, Gaudin P, Epstein JI. Rare expression of high-molecular-weight cytokeratin in adenocarcinoma of the prostate gland. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 147-152.

25. McNeal JE, Yemoto CEM. Spread of adenocarcinoma within ducts and acini: morphologic and clinical correlations. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 802-814.

26. Kasper S, Sheppard PC, Yan Y et al. Development, progression and androgen-dependence of prostate tumors in probasin-large T antigen transgenic mice: a model for prostate cancer. *Lab Invest* 1998; 78: 319-333.

27. Garabedjian EM, Humphrey PA, Gordon JI. A transgenic mouse model of metastatic prostate cancer originating from neuroendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15382-15387.

28. Cheng L, Shan A, Cheville JC, Qian J, Bostwick DG. Atypical adenomatous hyperplasia of the prostate: a premalignant lesion? *Cancer Res* 1998; 58: 389-391.

29. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate. *Am J Pathol* 1999; 155: 1985-1992.

30. Simons BD, Morrison AS, Young RH, Verhoek-Oftedahl W. The relation of surgery for prostatic hypertrophy to carcinoma of the prostate. *Am J Epidemiol* 1993; 138: 294-300.

31. Shah R, Mucci NR, Amin A, Macoska JA, Rubin MA. Postatrophic hyperplasia of the prostate gland. Neoplastic precursor or innocent bystander?. *Am J Pathol* 2001; 158: 1767-1773.

32. Van Brussel JP, Mickisch GHJ. Prognostic factors in prostate and testis cancer. *BJU International* 1999; 83: 910-917.

33. Dhom G. Epidemiologic aspects of latent and clinically manifest carcinoma of the prostate. *J Cancer Res Clin Oncol* 1983; 106: 210-218.

34. Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE, Crissman JD. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol* 1993; 150: 379-385.

35. Kabalin JN, McNeal JE, Price HM, Freiha FS, Stamey TA. Unsuspected adenocarcinoma of the prostate in patients undergoing cystoprostatectomy for other causes: incidences, histology and morphometric observations. *J Urol* 1989; 141: 1091-1094.

36. McNeal JE, Bostwick DG, Kindrachuk RA, Redwine EA, Freiha FS, Stanley TA. Patterns of progression in prostate cancer. *Lancet* 1986; 1: 60-63.

37. Scardino PT, Weaver R, Hudson MA. Early detection of prostate cancer. *Hum Pathol* 1992; 23: 211-222.

38. Byar DP, Mostofi FK. Cancer of the prostate in men less than 50 years old: an analysis of 51 cases. *J Urol* 1969; 102: 726-733.

39. Smith CV, Bauer JJ, Connelly RR et al. Prostate cancer in men age 50 years or younger: a review of the Department of Defense Center for Prostate Disease Research Multicenter Prostate Cancer Database. *J Urol* 2000; 164: 1964-1967.

40. Bumpus HC Jr. Carcinoma of the prostate. A clinical study of 100 cases. *Surg Gynecol Obstet* 1926; 43: 150-155.

41. Vickery AL Jr, Kerr WS Jr. Carcinoma of the prostate treated by radical prostatectomy. A clinicopathological survey of 187 cases followed for 5 years and 148 cases followed for 10 years. *Cancer* 1963; 16: 1598-1608.

42. Zincke H, Oesterling JE, Blute ML, Bergstrahl EJ, Myers RP, Barrett DM. Long-term (15 years) results after radical prostatectomy for clinically localized (stage T2c or lower) prostate cancer. *J Urol* 1994; 152: 1850-1857.

43. Catalona WJ, Smith DS. Five year tumor recurrence rates after anatomical radical prostatectomy for prostate cancer. *J Urol* 1994; 152: 1837-1842.

44. Culkin DJ, Wheeler JS Jr, Castelli M, Fresco R, Canning JR. Carcinoma of the prostate in a 25-year-old man: a case report and review of the literature. *J Urol* 1986; 136: 684-685.

45. Shimada H, Misugi K, Sasaki Y, Iizuka A, Nishihira H. Carcinoma of the prostate in childhood and adolescence: report of a case and review of the literature. *Cancer* 1980; 46: 2534-2542.

46. Etzioni R, Cha R, Feuer EJ, Davidov O. Asymptomatic incidence and duration of prostate cancer. *Am J Epidemiol* 1998; 148: 775-785.

47. Zhang Y, Kreger BE, Dorgan JF et al. Parental age at child's birth and son's risk of prostate cancer. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 1208-1212.

48. Janerich DT, Hayden CL, Thompson WD, Selenskas SL, Mettlin C. Epidemiologic evidence of perinatal influence in the etiology of adult cancers. *J Clin Epidemiol* 1989; 42: 151-157.

49. Calle EE. Do anthropometric measures predict risk of prostate cancer? *Am J Epidemiol* 2000; 151: 550-553.

50. Schuurman AG, Goldbohm RA, Dorant E, van den Brandt PA. Anthropometry in relation to prostate cancer risk in the Netherlands Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 541-549.
51. Ross RK, Henderson BE. Do diet and androgens alter prostate cancer risk via a common etiologic pathway?. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 252-254.
52. Platz EA, Giovannucci E, Rimm EB et al. Retrospective analysis of birth weight and prostate cancer in the Health Professionals Follow-up study. *Am J Epidemiol* 1998; 147: 1140-1144.
53. Parker SL, Davis KJ, Wingo PA, Ries LA, Heath CW. Cancer statistics by race and ethnicity. *CA Cancer J Clin* 1998; 48: 31-48.
54. Guo Y, Sigman DB, Borkowski A, Kyprianou N. Racial differences in prostate cancer growth: apoptosis and cell proliferation in Caucasian and African-american patients. *Prostate* 2000; 42: 130-136.
55. Breslow N, Chan CW, Dhom G et al. Latent carcinoma of prostate in autopsy in seven areas. *Int J Cancer* 1977; 20: 680-688.
56. Glover FE, Coffey DS, Douglas LL et al. The epidemiology of prostate cancer in Jamaica. *J Urol* 1998; 159: 1984-1986; (discusión; 159: 1986-1987).
57. Newill VA. Distribution of cancer mortality among ethnic subgroups of the white population of New York City, 1953-1958. *JNCI* 1961; 26: 405-417.
58. Ingles SA, Coetzee GA, Ross RK et al. Association of prostate cancer with vitamin D receptor haplotypes in African-Americans. *Cancer Res* 1998; 58: 1620-1623.
59. Giovannucci E, Stampfer M, Krithivas K et al. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3320-3323.
60. Robbins AS, Whittemore AS, Thom DH. Differences in socioeconomic status and survival among white and black men with prostate cancer. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 409-416.
61. Lesko SM, Rosenberg L, Shapiro S. Family history and prostate cancer risk. *Am J Epidemiol* 1996; 144: 1041-1047.

62. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of family prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3367-3371.

63. Grönberg H, Bergh A, Damber JE, Emanuelsson M. Cancer risk in families with hereditary prostate carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 1315-1321.

64. Keetch DW, Humphrey PA, Smith DS, Stahl D, Catalona WJ. Clinical and pathological features of hereditary prostate cancer. *J Urol* 1996; 155: 1841-1843.

65. Karayi MK, Neal DE, Markham AF. Current status of linkage studies in hereditary prostate cancer. *BJU International* 2000; 86: 659-669.

66. Foster CS, Bostwick DG, Bonkhoff H et al. Cellular and molecular pathology of prostate cancer precursors. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2000; 205: 19-43.

67. Sun Y, Lin J, Katz AE, Fisher PB. Human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 is expressed in human tumor cell lines and prostate carcinoma patient blood samples. *Cancer Res* 1997; 57: 18-23.

68. Benedit P, Paciucci R, Thomson TM et al. PTOV1, a novel protein overexpressed in prostate cancer containing a new class of protein homology blocks. *Oncogene* 2001; 20: 1455-1464.

69. Kasper S, Sheppard PC, Yan Y et al. Development, progression and androgen-dependence of prostate tumors in probasin-large T antigen transgenic mice: a model for prostate cancer [corrected i revisat de l'article publicat originalment a *Lab Invest* 1998; 78 (3): 319-33]. *Lab Invest* 1998; 78 (6): I-XV.

70. Young RH, Srigley JR, Amin MB, Ulbright TM, Cubilla AL, eds. *Tumors of the prostate gland, seminal vesicles, male urethra and penis*. AFIP. Washington DC; 2000.

71. Glantz GM. Cirrhosis and carcinoma of the prostate gland. *J Urol* 1964; 91: 291-293.

72. Jaffe JM, Malkowicz B, Walker AH et al. Association of SRD5A2 genotype and pathological characteristics of prostate tumors. *Cancer Res* 2000; 60: 1626-1630.

73. Marcelli M, Ittman M, Mariani S et al. Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 944-949.

74. Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P et al. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res* 1999; 59: 803-806.

75. Koivisto P, Kononen J, Palmberg C et al. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 314-319.

76. Kolonel LN. Nutrition and prostate cancer. *Cancer Causes Control* 1996; 7: 83-94

77. Feldman D, Zhao XY, Krishnan AV. Vitamin D and prostate cancer. *Endocrinology* 2000; 141: 5-9

78. Lu QY, Hung JC, Heber D et al. Inverse associations between plasma lycopene and other carotenoids and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 749-756.

79. Tavani A, Gallus S, Franceschi S, La Vecchia C. Calcium, dairy products, and the risk of prostate cancer. *Prostate* 2001; 48: 118-121.

80. Clark LC, Dalkin B, Krongrad A et al. Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. *Br J Urol* 1998; 81: 730-734.

81. Schulman CC, Zlotta AR, Denis L, Schröder FH, Sakr WA. Prevention of prostate cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2000; 205: 50-61.

82. Haenszel W, Kurihara M. Studies of Japanese migrants. I: Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1968; 40: 43-68.

83. Sharma-Wagner S, Chokkalingam AP, Malke HSR, Stone BJ, McLaughlin JK, Hsing AW. Occupation and prostate cancer risk in Sweden. *JOEM* 2000; 42: 517-525.

84. Van der Gulden JWJ, Vogelzang PFJ. Farmers at risk for prostate cancer. *Br J Urol* 1996; 77: 6-14.

85. Acquavella J, Olsen G, Cole P et al. Cancer among farmers: a meta-analysis. *Ann Epidemiol* 1998; 8: 64-74.

86. Krstev S, Baris D, Stewart PA, Hayes RB, Blair A, Dosemeci M. Risk for prostate cancer by occupation and industry: a 24-state death certificate study. *Am J Ind Med* 1998; 34: 413-420.
87. Waalkes MP, Rehm S. Cadmium and prostate cancer. *J Toxicol Environ Health* 1994; 43: 251-269.
88. Morrison HI, Wilkins K, Semenciw R, Mao Y, Wigle D. Herbicides and cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1866-1874.
89. Achanzar WE, Diwan BA, Liu J, Quader ST, Webber MM, Waalkes MP. Cadmium-induced malignant transformation of human prostate epithelial cells. *Cancer Res* 2001; 61: 455-458.
90. Pour P. Prostatic cancer induced in MRC rats by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine and N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine. *Carcinogenesis* 1983; 4: 49-55.
91. Nomura AMY, Kolonel L. Prostate cancer: a current perspective. *Am J Epidemiol* 1991; 13: 200-207.
92. Colditz G. Consensus conference: smoking and prostate cancer. *Cancer Causes Control* 1996; 7: 560-562.
93. Mills PK, Beeson WL, Phillips RL et al. Cohort study of diet and lifestyle and prostate cancer in Adventist men. *Cancer* 1989; 64: 598-604.
94. Cerhan JR, Torner JC, Lynch CF et al. Association of smoking, body mass, and physical activity with risk of prostate cancer in the Iowa 65+ Rural Health Study (United States). *Cancer Causes Control* 1997; 8: 229-238.
95. Hsing AW, McLaughlin JK, Hrubee Z, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. Tobacco use and prostate cancer: 26-year follow-up of US veterans. *Am J Epidemiol* 1991; 13: 437-441.
96. Rodríguez C, Tatham LM, Thun MJ, Calle EE, Heath CW Jr. Smoking and fatal prostate cancer in a large cohort of adult men. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 466-475.
97. Coughlin SS, Neaton JD, Sengupta A. Cigarette smoking as a predictor of death from prostate cancer in 348,874 men screened from the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 1002-1006.

98. Lund Nilsen TI, Johnsen R, Vatten LJ. Socio-economic and lifestyle factors associated with the risk of prostate cancer. *Br J Cancer* 2000; 82: 1358-1363.

99. Lotufo PA, Lee IM, Ajani UA, Hennekens CH, Manson JE. Cigarette smoking and risk of prostate cancer in the Physicians' Health Study (United States). *Int J Cancer* 2000; 87: 141-144.

100. Heinonen OP, Albanes D, Virtamo J et al. Prostate cancer and supplementation with α -tocopherol and β -carotene: incidence and mortality in a controlled trial. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 440-446.

101. Breslow RA, Weed DL. Review of epidemiologic studies of alcohol and prostate cancer: 1971-1996. *Nutr Cancer* 1998; 30: 1-13.

102. Hayes RB, Morris Brown L, Schoenberg JB et al. Alcohol use and prostate cancer risk in US blacks and whites. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 692-697.

103. Massey FJ, Bernstein GS, O'Fallon WM et al. Vasectomy and health. Results from a large cohort study. *JAMA* 1984; 252: 1023-1029.

104. Rosenberg L, Palmer JR, Zauber AG, Warshauer ME, Stolley PD, Shapiro S. Vasectomy and the risk of prostate cancer. *Am J Epidemiol* 1990; 132: 1051-1055.

105. Mettlin C, Natarajan N, Huben R. Vasectomy and prostate cancer risk. *Am J Epidemiol* 1990; 132: 1056-1061.

106. Bernal E, Latour J, Pradas F, Gómez LI. The association between vasectomy and prostate cancer: a systematic review of the literature. *Fertil Steril* 1998; 70: 191-199.

107. Lesko SM, Louik C, Vezina R, Rosenberg L, Shapiro S. Vasectomy and prostate cancer. *J Urol* 1999; 161: 1848-1853.

108. Emard J, Drouin G, Thouez J, Ghadrian P. Vasectomy and prostate cancer in Quebec, Canada. *Health Place* 2001; 7: 131-139.

109. Hackney AC, Sinning WE, Bruot BC. Reproductive hormonal profiles of endurance-trained and untrained males. *Med Sci Sports Exerc* 1988; 20: 60-65.

110. Hackney AC. The male reproductive system and endurance exercise. *Med Sci Sports Exerc* 1996; 28: 180-189.

111. Liu S, Lee I-M, Linson P, Ajani U, Buring JE, Hennekens CH. A prospective study of physical activity and risk of prostate cancer in US physicians. *Int J Epidemiol* 2000; 29: 29-35.
112. Harvei S, Kravdal O. The importance of marital and socioeconomic status in incidence and survival of prostate cancer. An analysis of complete Norwegian birth cohorts. *Prev Med* 1997; 26: 623-632.
113. La Vecchia C, Franceschi S, Talamini R, Negri E, Boyle P, D'Avanzo B. Marital status, indicators of sexual activity and prostatic cancer. *J Epidemiol Community Health* 1993; 47: 450-453.
114. Talamini R, La Vecchia C, Decarli A, Negri E, Franceschi S. Nutrition, social factors and prostatic cancer in a Northern Italian population. *Br J Cancer* 1986; 53: 817-821.
115. Steenland K, Nowlin S, Palu S. Cancer incidence in the National Health and Nutrition Survey. I. Follow-up data: diabetes, cholesterol, pulse and physical activity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4: 807-811.
116. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Diabetes mellitus and risk of prostate cancer (United States). *Cancer Causes Control* 1998; 9: 3-9.
117. Thompson MM, Garland C, Barrett-Connor E, Khaw KT, Friedlander NJ, Wingard DL. Heart disease risk factors, diabetes and prostatic cancer in an adult community. *Am J Epidemiol* 1989; 129: 511-517.
118. Hayes RB, Pottern LM, Strickler H et al. Sexual behavior, STDs and risks for prostate cancer. *Br J Cancer* 2000; 82: 718-725.
119. Serth J, Panitz F, Paeslack U, Kuczyk MA, Jonas U. Increased levels of human papillomavirus type 16 DNA in a subset of prostate cancers. *Cancer Res* 1999; 59: 823-825.
120. Dillner J, Knekt P, Boman J et al. Sero-epidemiological association between human-papillomavirus infection and risk of prostate cancer. *Int J Cancer* 1998; 75: 564-567.
121. Hisada M, Rabkin CS, Strickler HD, Wright WE, Christianson RE, van der Berg BJ. Human papillomavirus antibody and risk of prostate cancer. *JAMA* 2000; 283: 340-341 (carta).
122. Centifanto YM, Kaufman HE, Zam ZS, Drylie DM, Deardourff SL. Herpes virus particles in prostate carcinoma cells. *J Virol* 1973; 12: 1608-1611.

123. Bostwick DG, Foster CS. Predictive factors in prostate cancer: current concepts from the 1999 College of American Pathologists Conference on Solid Tumors Prognostic Factors and the 1999 World Health Organization Second International Consultation on Prostate Cancer. *Sem Urol Oncol* 1999; 17: 222-272.

124. Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond EH et al. Prognostic factors in prostate cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 995-1000.

125. Whitmore WF Jr. Symposium on hormones and cancer therapy; hormone therapy in prostatic cancer. *Am J Med* 1956; 21: 697-713.

126. Jewett HJ. The present status of radical prostatectomy for stages A and B prostatic cancer. *Urol Clin North Am* 1975; 2: 105-124.

127. International Union Against Cancer. *Próstata (ICD-0 C61)*. A: Sobin IH, Wittekind Eds. *TNM Clasificación de los tumores malignos*. Pulso ediciones s.a. Barcelona 1999; 174-177.

128. Broders AC. Carcinoma: grading and practical application. *Arch Pathol* 1926; 2: 376-381.

129. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 1966; 50: 125-128.

130. Gleason DF, Mellinger GT, VACURG. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974; 111: 58-64.

131. Gleason DF. The Veterans Administration Cooperative Urological Research Group: histological grading and clinical staging of prostatic carcinoma. A: Tannenbaum M (ed) . *Urological Pathology: the Prostate*. Lea & Febiger, Philadelphia 1977: 171-198.

132. Aihara M, Wheeler TM, Ohori M et al. Heterogeneity of prostate cancer in radical prostatectomy specimens. *Urology* 1994; 43: 60-66.

133. Pan CC, Potter SR, Partin AW, Epstein JI. The prognostic significance of tertiary Gleason. Patterns of higher grade in radical prostatectomy specimens. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 563-569.

134. Bostwick DG. Gleason grading of prostatic needle biopsies. Correlation with grade in 316 matched prostatectomies. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 796-803.

135. Epstein JI. Gleason score 2-4 adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 477-478.

136. Mostofi FK. Grading of prostatic carcinoma. *Cancer Chemother Rep* 1975; 59: 111-117.

137. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP et al. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979; 17: 159-163.

138. Schulz P, Stucka R, Feldmann H, Combriato G, Klobeck HG, Fittler F. Sequence of a cDNA clone encompassing the complete mature human prostate specific antigen (PSA) and an unspliced leader sequence. *Nucl Acid Res* 1988; 16: 6226.

139. Vessella RL, Lange PH. Issues in the assessment of PSA immunoassays. *Urol Clin North Am* 1993; 20: 607-619.

140. Filella X, Molina R, Alcover J, Carretero P, Ballesta AM. Detection of nonprostatic PSA in serum and nonserum samples from women. *Int J Cancer* 1996; 68: 424-427.

141. Xu J, Kalos M, Stolk JA et al. Identification and characterization of prostein, a novel prostate-specific protein. *Cancer Res* 2001; 61: 1563-1568.

142. Montironi R, Mazzucchelli R, Algaba F, Bostwick DG, Krongrad A. Prostate-specific antigen as a marker of prostate disease. *Virchows Arch* 2000; 436: 297-304.

143. Brawer MK. How to use PSA in the early detection or screening for prostatic carcinoma. *CA Cancer J Clin* 1995; 45: 148-164.

144. Hawkins CA, Bergstralh EJ, Lieber MM, Zincke H. Influence of DNA ploidy and adjuvant treatment on progression and survival in patients with pathologic stage T3 (pT3) prostate cancer after radical retropubic prostatectomy. *Urology* 1995; 46: 356-364.

145. Deitch AD, Miller GJ, deVere White RW. Significance of abnormal diploid DNA histograms in localized prostate cancer and adjacent benign prostatic tissue. *Cancer* 1993; 72: 1692-1700.

146. Alcaraz A, Takahashi S, Brown JA et al. Aneuploidy and aneusomy of chromosome 7 detected by fluorescence in situ hybridization are markers of poor prognosis in prostate cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 3998-4002.

147. Barranco MA, Alcaraz A, Corral JM et al. Numeric alterations in chromosome 7 and 8 detected by fluorescent in situ hybridization correlate with high-grade localized prostate cancer. *Eur Urol* 1998; 34: 419-425.

148. Randolph TL, Amin MB, Ro JY, Ayala AG. Histologic variants of adenocarcinoma and other carcinomas of the prostate: pathologic criteria and clinical significance. *Mod Pathol* 1997; 10: 612-629.

149. Brinker DA, Potter SR, Epstein JI. Ductal adenocarcinoma of the prostate diagnosed on needle-biopsy. Correlation with clinical and radical prostatectomy findings and progression. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 1471-1479.

150. Samaratunga H, Singh M. Distribution pattern of basal cells detected by cytokeratin 34 beta E12 in primary prostatic duct adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 1997; 21: 435-440.

151. Bock BJ, Bostwick DG. Does prostatic ductal adenocarcinoma exist?. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 781-785.

152. Ro JY, Grignon DJ, Ayala AG, Fernández PL, Ordoñez NG, Wishnow KI. Mucinous adenocarcinoma of the prostate: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Pathol* 1990; 21: 593-600.

153. Shannon RL, Ro JY, Grignon DJ et al. Sarcomatoid carcinoma of the prostate: a clinico-pathologic study of 12 patients. *Cancer* 1992; 69: 2676-2682.

154. Luque RJ, González R, Vicioso L, Requena MJ, López Beltrán A. Carcinosarcoma prostático sincrónico: presentación de 2 casos y revisión de la literatura. *Actas Urol Esp* 2000; 24: 173-178.

155. Levi AW, Epstein JI. Pseudohiperplastic prostatic adenocarcinoma on needle biopsy and simple prostatectomy. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 1039-1046.

156. Egan AJM, Bostwick DG. Prediction of extraprostatic extension of prostate cancer based on needle biopsy findings: perineural invasion lacks significance on multivariate analysis. *Am J Surg Pathol* 1997; 21: 1496-1500.

157. Baisden BL, Kahane H, Epstein JI. Perineural invasion, mucinous fibroplasia and glomerulations. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 918-924.

158. McIntire TL, Franzini DA. The presence of benign prostate glands in perineural spaces. *J Urol* 1986; 135: 507-509.

159. D'Amico AV, Wu Y, Chen MH, Nash M, Renshaw AA, Richie JP. Perineural invasion as a predictor of biochemical outcome following radical prostatectomy for select men with clinically localized prostate cancer. *J Urol* 2001; 165: 126-129.

160. Di Sant'Agnese PA. Divergent neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Sem Diag Pathol* 2000; 17: 149-161.

161. Silberman MA, Partin AW, Veltri RW, Epstein JI. Tumor angiogenesis correlates with progression after radical prostatectomy but not with pathologic stage in Gleason sum 5 to 7 adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1997; 79: 772-779.

162. Rogatsch H, Hittmair A, Reissigl A, Mikuz G, Feichtinger H. Microvessel density in core biopsies of prostatic adenocarcinoma: a stage predictor?. *J Pathol* 1997; 182: 205-210.

163. Barth PJ, Weingartner K, Kohler HH et al. Assessment of vascularization in prostate carcinoma: a morphometric investigation. *Hum Pathol* 1996; 27: 1306-1310.

164. Wakui S, Furusato M, Itoh T et al. Tumor angiogenesis in prostate carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. *J Pathol* 1992; 168: 257-262.

165. Bostwick DG, Wheeler TM, Blute M et al. Optimized microvessel density analysis improves prediction of cancer from prostate needle biopsies. *Urology* 1996; 48: 47-57.

166. McNeal JE, Yemoto CE. Significance of demonstrable vascular space invasion for the progression of prostatic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1351-1360.

167. Gettman MT, Bergstralh EJ, Blute M et al. Prediction of patient outcome in pathologic stage T2 adenocarcinoma of the prostate: lack of significance for microvessel density analysis. *Urology* 1998; 51: 79-85.

168. Blom JH, Ten Kate FJ, Schroeder H, Van der Heul RO. Morphometrically estimated variation in nuclear size: a useful tool in grading prostatic cancer. *Urol Res* 1990; 18: 93-99.

169. Ventura F, Massagué J. Control de la proliferació cel.lular i càncer. A: González F, Guinovart JJ, eds. *Lliçons de patologia molecular*. 1ª ed. Edicions de la Universitat de Barcelona. Barcelona; 2000: 1-25.

170. Nurse P. *A long twentieth century of the cell cycle and beyond.* *Cell* 2000; 100: 71-78.
171. Sherr CJ. *Cancer cell cycles.* *Science* 1996; 274: 1672-1677.
172. Fernández PL, Jares P, Rey MJ, Campo E, Cardesa A. *Cell cycle regulators and their abnormalities in breast cancer.* *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1998; 51: 305-309.
173. Nadal A, Jares P, Fernández PL et al. *Alteracions del control del cicle cel.lular en neoplàsies humanes.* *Treballs de la SCB* 1999; 49: 41-52.
174. Elledge SJ. *Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis.* *Science* 1996; 1664-1672.
175. Dyson N. *The regulation of E2F by pRB-family proteins.* *Genes Dev* 1998; 12: 2245-2262.
176. Sherr CJ, Roberts JM. *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.* *Genes Dev* 1999; 13: 1501-1512.
177. Morgan DO. *Principles of CDK regulation.* *Nature* 1995; 374: 131-134.
178. Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ. *Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle.* *Cell* 1991; 65: 701-713.
179. Fisher RP, Morgan DO. *A novel cyclin associates with MO15/cdk7 to form the cdk-activating kinase.* *Cell* 1994; 78: 713-724.
180. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu et al. *Waf1, a potential mediator of p53 tumor suppression.* *Cell* 1993; 75: 817-825.
181. Hall M, Peters G. *Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors in human cancer.* *Adv Cancer Res* 1996; 68: 67-108.
182. Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. *Mice lacking p21^{cip1/waf1} undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control.* *Cell* 1995; 82: 675-684.
183. Niculescu AB, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI. *Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication.* *Mol Cell Biol* 1998; 18: 629-643.

184. Chang BD, Xuan Y, Broude EV et al. Role of p53 and p21^{waf1/cip1} in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* 1999; 18: 4808-4818.

185. Nevins JR. Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ* 1998; 9: 585-593.

186. Dimri GP, Nakanishi M, Desprez PY, Smith JR, Campisi J. Inhibition of E2F activity by the cyclin-dependent protein kinase inhibitor p21 in cells expressing or lacking a functional retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 2987-2997.

187. Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer and heritable disorders. *Cell* 2000; 103: 295-309.

188. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998; 282: 1497-1501.

189. Robles SJ, Adami GR. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16^{lnk4a} enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 1998; 16: 1113-1123.

190. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16^{lnk4a}. *Cell* 1997; 88: 593-602.

191. Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 1994; 211: 90-98.

192. Chang BD, Broude EV, Fang J et al. p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}-induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells. *Oncogene* 2000; 19: 2165-2170

193. Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H et al. Cloning of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; 78: 59-66.

194. Durand B, Gao FB, Raff M. Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} and the timing of oligodendrocyte differentiation. *EMBO J* 1997; 16: 306-317.

195. Cerdón-Cardó C, Koff A, Drobnjak M et al. Distinct altered patterns of p27^{KIP1} gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1284-1291.
196. Guo Y, Sklar GN, Borkowski A, Kyprianou N. Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) protein in human prostate cancer correlates with tumor grade. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 2269-2274.
197. Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ et al. Expression of the cell cycle regulator p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nature Med* 1997; 3: 222-225.
198. Del Pizzo JJ, Borkowski A, Jacobs SC, Kyprianou N. Loss of cell cycle regulators p27^{Kip1} and cyclin E in transitional cell carcinoma of the bladder correlates with tumor grade and patient survival. *Am J Pathol* 1999; 155: 1129-1136.
199. Loda M, Cukor B, Tam SW et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Med* 1997; 3: 231-234.
200. Hirano K, Hirano M, Zeng Y et al. Cloning and functional expression of a degradation-resistant novel isoform of p27Kip1. *Biochem J* 2001; 353 (part 1): 51-57.
201. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993; 362: 849-852.
202. Jost CA, Marin MC, Kaelin WG Jr. p73 is a simian [correcció de human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 1997; 389: 191-194 [errada a: *Nature* 1999; 399: 817].
203. Yang A, Kaghad M, Wang Y et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating death-inducing and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998; 2: 305-316.
204. Weinert TA, Kiser GL, Hartwell LH. Mitotic checkpoints genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev* 1994; 8: 652-665.
205. Canman CE, Lim DS, Cimprich KA et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 1998; 281: 1677-1679.

206. Weinert T. A DNA damage checkpoint meets the cell cycle engine. *Science* 1997; 277: 1450-1451.
207. Piwnicka-Worms H. Cell cycle. Fools rush in. *Nature* 1999; 401: 535, 537.
208. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266: 1821-1828.
209. Cross SM, Sanchez CA, Morgan CA et al. A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* 1995; 267: 1353-1356.
210. de Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2882-2885.
211. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; 96: 245-254.
212. Vogt C. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete (*Alytes obstetricians*). Solothurn, Suissa: Jent und Gassman; 1842.
213. Lockshin R, Williams C. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* 1965; 11: 803-809.
214. Tata JR. Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Dev Biol* 1966; 13: 77-94.
215. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
216. Glucksmann A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 1951; 26: 59-86.
217. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335: 440-442.
218. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776.
219. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J, eds. *Molecular cell biology*, 4^a Ed. W.H Freeman and Company. New York; 2000: 1045.

220. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383-424.

221. Pegoraro L, Palumbo A, Erikson J et al. A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 7166-7170.

222. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *TIBS* 2001; 26: 61-66.

223. Wang HG, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 1996; 87: 629-638.

224. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y et al. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; 399: 483-487.

225. Antonsson B, Martinou JC. The bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 2000; 256: 50-57.

226. Wang JL, Liu D, Zhang ZJ. Structure-based discovery of an organic compound that binds bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *PNAS* 2000; 97: 7124-7129.

227. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408: 307-310.

228. Linzer DH, Levine AJ. Characterization of a 54 K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; 17: 43-52.

229. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 352: 345-357.

230. Benchimol S, Lamb P, Crawford LV et al. Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet* 1995; 11: 505-510.

231. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-526.

232. Bruckheimer EM, Kyprianou N. Apoptosis in prostate carcinogenesis. *Cell Tissue Res* 2000; 301: 153-162.

233. Gil J. *Apoptosi i càncer. A: Setzè Congrés de Metges i Biòlegs de Llengua Catalana. Llibre de Ponències. 2000; 325-328.*

234. Malik S, Roeder RG. *Transcriptional regulation through mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. TIBS 2000; 25: 277-283.*

235. Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I et al. *A controlled trial of intratumoral Onyx-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. Nature Med 2000; 6: 879-885.*

236. Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100: 57-70.*

237. Folkman J. *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nature Med 1995; 1: 27-31.*

238. Fidler IJ, Kerbel RS, Ellis LM. *Biology of cancer: angiogenesis. A: DeVita VT Jr, Hellmoro S, Rosenberg SA, eds. Cancer. Principles & practice of oncology. 6^a ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia; 2001: 137-140.*

239. Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH. *Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. J Biol Chem 2000; 275: 22607-22610.*

240. Van Den Brule FA, Waltregny D, Castronovo V. *Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. J Pathol 2001; 193: 80-87.*

241. Van Den Brule FA, Waltregny D, Liu FT, Castronovo V. *Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. Int J Cancer 2000; 89: 361-367.*

242. Aaltomaa S, Lipponen P, Ala-Opas M, Kosma VM. *Expression and prognostic value of CD44 standard and variant v3 and v6 isoforms in prostate cancer. Eur Urol 2001; 39: 138-144.*

243. Riese RJ, Chapman HA. *Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. Curr Opin Immunol 2000; 12: 107-113.*

244. Berquin IM, Sloane BF. *Cysteine proteases and tumor progression. Perspect Drug Discov Design 1994; 2: 371-388.*

245. Barrett AJ. Human cathepsin B1. *Biochem J* 1973; 131: 809-822.
246. Wang X, Chan SJ, Eddy RL et al. Chromosome assignment of cathepsin B (CTSB) to 8p22 and cathepsin H (CTSH) to 15q24-q25. *Cytogenet Cell Genet* 1987; 46: 710-711 (Comunicació).
247. Castiglioni T, Merino MJ, Elsner B, Lah TT, Sloane BF, Emmert-Buck MR. Immunohistochemical analysis of cathepsins D, B and L in human breast cancer. *Hum Pathol* 1994; 25: 857-862.
248. Ledakis P, Tester WT, Rosenberg N, Romero-Fischmann D, Daskal I, Lah TT. Cathepsins D, B and L in malignant human lung tissue. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 561-568.
249. Hughes SJ, Glover TW, Zhu XX et al. A novel amplicon at 8p22-23 results in overexpression of cathepsin B in esophageal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12410-12415.
250. Dohchin A, Suzuki J, Seki H, Masutani M, Shiroto H, Kawakami Y. Immunostained cathepsins B and L correlate with depth of invasion and different metastatic pathways in early stage gastric carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 482-487.
251. Häckel CG, Krueger S, Grote HJ et al. Overexpression of cathepsin B and urokinase plasminogen activator is associated with increased risk of recurrence and metastasis in patients with chondrosarcoma. *Cancer* 2000; 89: 995-1003.
252. Campo E, Muñoz J, Miquel R et al. Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patients survival. *Am J Pathol* 1994; 145: 301-309.
253. Kos J, Smid A, Krasovec M et al. Lysosomal proteases cathepsins D, B, H, L and their inhibitors stefins A and B in head and neck cancer. *Biol Chem* 1995; 376: 401-405.
254. Turnšek T, Kregan I, Lebez D. Acid sulphhydryl protease from calf lymph nodes. *Biochim Biophys Acta* 1975; 403: 514-520.
255. Shi G, Munger JS, Meara JP, Rich DH, Chapman HA. Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastolytic cysteine protease. *J Biol Chem* 1992; 267: 7258-7262.

256. Shi G, Webb AC, Foster KE et al. Human cathepsin S: chromosomal localization, gene structure and tissue distribution. *J Biol Chem* 1994; 269: 11530-11536.

257. Shi G, Villadangos JA, Dranoff G et al. Cathepsin S is required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 1999; 10: 197-206.

258. De Marzo AM, Nelson WG, Meeker AK, Coffey DS. Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *J Urol* 1998; 160: 2381-2392.

259. Bonkhoff H, Fixemer T, Remberger K. Relation between Bcl-2 cell proliferation and the androgen receptor status in prostate tissue and precursors of prostate cancer. *Prostate* 1998; 34: 251-258.

260. Van der Kwast TH, Labrie F, Tetu B. Persistence of high-grade prostatic intra-epithelial neoplasia under combined androgen blockade therapy. *Hum Pathol* 1999; 30: 1503-1507.

261. Leav I, Lau KM, Adams JY et al. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol* 2001; 159: 79-92.

262. Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K. Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostatic lesions. *Am J Pathol* 1999; 155: 641-647.

263. Bonkhoff H, Stein U, Welter C, Remberger K. Differential expression of the PS2 protein in the human prostate cancer: association with premalignant changes and neuroendocrine differentiation. *Hum Pathol* 1995; 26: 824-828.

264. Cerdón-Cardó C. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995; 147: 545-560.

265. Bookstein R, Rio P, Madreperla SA et al. Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7762-7766.

266. Kubota Y, Fujunami K, Uemura H et al. Retinoblastoma gene mutations in primary human carcinoma cancer. *Prostate* 1995; 27: 314-320.

267. Wang H, Grand RJ, Milner AE, Armitae RJ, Gordon J, Gregory CD. Regression of apoptosis in human B-lymphoma cells by CD40-ligand and Bcl-2: relationship to the cell cycle and role of the retinoblastoma protein. *Oncogene* 1996; 13: 373-379.

268. Day ML, Zhao X, Vallorosi CJ et al. E-cadherin mediates aggregation-dependent survival of prostate and mammary epithelial cells through the retinoblastoma cell cycle control pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 9656-9664.

269. Mottaz AE, Markwalder R, Fey MF et al. Abnormal p53 expression is rare in clinically localized human prostate cancer: comparison between immunohistochemical and molecular detection of p53 mutations. *Prostate* 1997; 31: 209-215.

270. Keshgegian AA, Johnston E, Cnaan A. Bcl-2 oncoprotein positivity and high MIB-1 (Ki-67) proliferative rate are independent predictive markers for recurrence in prostate carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1998; 110: 443-449.

271. Humphrey PA, Swanson PE. Immunoreactive p53 protein in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Path Res Pract* 1995; 191: 881-887.

272. Tamboli P, Amin MB, Xu HJ, Linden MD. Immunohistochemical expression of retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes in prostatic intraepithelial neoplasia: comparison with prostatic adenocarcinoma and benign prostate. *Mod Pathol* 1998; 11: 247-252.

273. Koivisto P, Rantala I. Amplification of the androgen receptor gene is associated with p53 mutation in hormone-refractory recurrent prostate cancer. *J Pathol* 1999; 187: 237-241.

274. Grossfield GD, Olumi AF, Connolly JA et al. Locally recurrent prostate tumors following either radiation therapy or radical prostatectomy have changes in Ki-67 labelling index, p53 and bcl-2 immunoreactivity. *J Urol* 1998; 159: 1437-1443.

275. Baretton GB, Klenk U, Schmeller N, Löhrs U. Proliferation- and apoptosis-associated factors in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy: prognostic significance of p21/Waf1/Cip1 expression. *Br J Cancer* 1999; 80: 546-555.

276. Cheng L, Lloyd RV, Weaver AL et al. The cell cycle inhibitors p21^{Waf1} and p27^{Kip1} are associated with survival in patients treated by salvage prostatectomy after radiation therapy. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1896-1899.

277. Gao X, Chen YQ, Wu N et al. Somatic mutations of the Waf1/Cip1 gene in primary prostate cancer. *Oncogene* 1995; 11: 1395-1398.

278. Byrne RL, Wilson Home CH, Robinson MC et al. The expression of waf-1, p53 and bcl-2 in prostatic adenocarcinoma. *Br J Urol* 1997; 79: 190-195.

279. Matsuhima H, Sasaki T, Goto T et al. Immunohistochemical study of p21^{Waf1} and p53 proteins in prostatic cancer and their prognostic significance. *Hum Pathol* 1998; 29: 778-783.

280. Hobeika AC, Etienne W, Cruz PE, Subramaniam PS, Johnson HM. IFN- γ induction of p21^{Waf1} in prostate cancer cells: role in cell cycle, alteration of phenotype and invasive potential. *Int J Cancer* 1998; 77: 138-145.

281. Cote RJ, Shi Y, Groshen S et al. Association of p27^{Kip1} levels with recurrence and survival in patients with stage C prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 916-920.

282. Bonkhoff H. Analytical molecular pathology of epithelial-stromal interactions in the normal and neoplastic prostate. *Anal Quant Cytol Histol* 1998; 20: 437-442.

283. Nagle RB, Hao J, Knox JD, Dalkin BL, Clark V, Cress AE. Expression of hemidesmosomal and extracellular matrix proteins by normal and malignant human prostate tissue. *Am J Pathol* 1995; 146: 1498-1507.

284. Phler C, Fixemer T, Jung V, Dooley S, Remberger K, Bonkhoff H. In situ analysis of genes coding collagen IV a1 chain, laminin b1 chain and S-laminin in prostate tissue and prostate cancer. Increased basement membrane gene expression in metastatic lesions. *Prostate* 1998; 36: 143-150.

285. Boag AH, Young ID. Increased expression of the 72-kd type IV collagenase in prostatic adenocarcinoma. Demonstration by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Am J Pathol* 1994; 144: 585-591.

286. Nagle RB, Knox JD, Wolf C, Bowden T, Cress AE. Adhesion molecules, extracellular matrix and proteases in prostate carcinoma. *J Cell Biochem (Supl)* 1994; 19: 259-266.

287. Kuniyasu H, Troncoso P, Johnston D et al. Relative expression of type IV collagenase, E-cadherin and vascular endothelial growth factor / vascular permeability factor in prostatectomy specimens distinguishes organ-confined from pathologically advanced prostate cancers. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2295-2308.

288. Christofori G, Semb H. The role of the cell adhesion molecule E-cadherin as a tumor suppressor gene. *TIBS* 1999; 24: 73-76.

289. Guenette RS, Moolbroek M, Wong K, Wong P, Tenniswood M. Cathepsin B, a cysteine protease implicated in metastatic progression, is also expressed during regression of the rat prostate and mammary glands. *Eur J Biochem* 1994; 226: 311-321.

290. Sinha AA, Gleason DF, Staley NA, Wilson MJ, Sameni M, Sloane BF. *Cathepsin B in angiogenesis of human prostate: an immunohistochemical and immunoelectron microscopic analysis. Anat Rec 1995; 241: 353-362.*

291. Sinha AA, Wilson MJ, Gleason DF, Reddy PK, Sameni M, Sloane BF. *Immunohistochemical localization of cathepsin B in neoplastic human prostate. Prostate 1995; 26: 171-178.*

292. Sinha AA, Quast BJ, Korkowski JC et al. *The relationship of cathepsin B and stefin A mRNA localization identifies a potentially aggressive variant of human prostate cancer within a Gleason histologic score. Anticancer Res 1999; 19: 2821-2830.*

293. Cherry JP, Mordente JA, Chapman JR et al. *Analysis of cathepsin D forms and their clinical implications in human prostate cancer. J Urol 1998; 160: 2223-2228.*

294. Vetvicka V, Vetvickova J, Fusek M. *Role of procathepsin D activation peptide in prostate cancer growth. Prostate 2000; 44: 1-7.*

295. Stewart RJ, Panigraphy D, Flynn E, Folkman J. *Vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis are regulated by androgens in hormone responsive human prostate carcinoma. Evidence for androgen dependent destabilization of vascular endothelial growth factor transcripts. J Urol 2001; 165: 688-693.*

296. Isaacs JT, Lundmo PI, Berges R et al. *Androgen regulation of programmed cell death of normal and malignant prostatic cells. J Androl 1992; 13: 457-464.*

297. Nupponen NN, Kakkola L, Koivisto P, Visakorpi T. *Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostatic carcinoma. Am J Pathol 1998; 153: 141-148.*

298. McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM et al. *Expression of the protooncogen bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. Cancer Res 1992; 52: 6940-6944.*

299. Colombel M, Symmans F, Gil S et al. *Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone refractory human prostate cancers. Am J Pathol 1993; 143: 390-400.*

300. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P et al. *In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. Nature Genet 1995; 9: 401-406.*

301. Tilley WD, Buchanan G, Hickey TE, Bentel JM. Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 277-285.

302. Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV et al. Androgen receptor activation in prostate tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor and epidermal growth factor. *Cancer Res* 1994; 54: 5474-5478.

303. Scher HI, Zhang ZF, Nanus D, Kelly WK. Hormone and anti-hormone withdrawal therapy: implications for management of androgen independent prostate cancer. *Urology* 1996; 47 (Supl. 1A): 61-69.

304. De Marzo A, Putzi MJ, Nelson WG. New concepts in the pathology of prostatic epithelial carcinogenesis. *Urology* 2001; 57 (Supl. 4):103-114.

305. Wilkinson BA, Hamdy FC. State-of-the-art staging in prostate cancer. *BJU International* 2001; 87: 423-430.

306. Ohori M, Abbas F, Wheeler TM, Kattan MW, Scardino PT, Lerner SP. Pathological features and prognostic significance of prostate cancer in the apical section determined by whole-mount histology. *J Urol* 1999; 161: 500-504.

307. Dean PN, Jett JH. Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow microfluorometry. *J Cell Biol* 1974; 60: 525-527.

308. Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B et al. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry* 1993; 14: 472-477.

309. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 1333-1335.

310. Salem CE, Tomasic NA, Elmajian DA et al. p53 protein and gene alterations in pathological stage C prostate carcinoma. *J Urol* 1997; 158: 510-514.

311. Kirschke H, Wiederanders B. Cathepsin S and related lysosomal endopeptidases. *Methods Enzimol* 1994; 244: 500-511.

312. Nadal A, Campo E, Pinto J et al. p53 expression in normal, dysplastic and neoplastic laryngeal epithelium. Absence of correlation with prognostic factors. *J Pathol* 1995; 175: 181-188.

313. Rey MJ, Fernández PL, Jares P et al. p21^{WAF1/Cip1} is associated with cyclin D1^{CCND1} expression and tubular differentiation but is independent of p53 overexpression in human breast carcinoma. *J Pathol* 1998; 184: 265-271.

314. Quintanilla-Martínez L, Thieblemont C, Fend F et al. Mantle cell lymphomas lack expression of p27^{kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Am J Pathol* 1998; 153: 175-182.

315. Cheng L, Leibovich BC, Bergstralh EJ et al. p53 alteration in regional lymph node metastases from prostate carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 2455-2459.

316. Bauer JJ, Connelly RR, Sesterhenn IA et al. Biostatistical modeling using traditional variables and genetic biomarkers for predicting the risk of prostate carcinoma recurrence after radical prostatectomy. *Cancer* 1997; 79: 952-962.

317. Lipponen P, Vesalainen S. Expression of the apoptosis suppressing protein bcl-2 in prostatic adenocarcinoma is related to tumor malignancy. *Prostate* 1997; 32: 9-15.

318. Osman I, Drobnyak M, Fazzari M, Ferrara J, Scher HI, Cordón-Cardó C. Inactivation of the p53 pathway in prostate cancer: impact on tumor progression. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2082-2088.

319. Chevillet JC, Lloyd RV, Sebo TJ et al. Expression of p27^{kip1} in prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol* 1998; 11: 324-328.

320. Yang RM, Naitoh J, Murphy M et al. Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. *J Urol* 1998; 159: 941-945.

321. Fornaro M, Tallini G, Zheng DQ, Flanagan WM, Manzotti M, Languino LR. p27^{kip1} acts as a downstream effector of and is coexpressed with the β_{1c} integrin in prostatic adenocarcinoma. *J Clin Invest* 1999; 103: 321-329.

322. Thomas GV, Schrage MI, Rosenfelt L et al. Preoperative prostate needle biopsy p27 correlates with subsequent radical prostatectomy p27, gleason grade and pathological stage. *J Urol* 2000; 164: 1987-1991.

323. Jiménez Villa J. *Conceptos de Estadística. A: Martín Zurro A, Cano Pérez JF, eds. Atención Primaria. Conceptos, organización y práctica clínica. Vol I. 4ª edición. Harcourt Brace. Madrid 1999; 351-377.*

324. Ferrán M, ed. *SPSS para Windows. Programación y análisis estadístico. McGraw Hill. Madrid; 1997: 211-225.*

325. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. *p53 mutations in human cancers. Science 1991; 253: 49-53.*

326. Ruijter E, van de Kaa C, Miller G, Ruiters D, Debruyne F, Schalken J. *Molecular genetics and epidemiology of prostatic carcinoma. Endocr Rev 1999; 20: 22-45.*

327. Leite KRM, Franco MF, Srougi M et al. *Abnormal expression of MDM2 in prostate carcinoma. Mod Pathol 2001; 14: 428-436.*

328. Rakozy C, Grignon DJ, Li YW. *p53 gene alterations in prostate cancer after radiation failure and their association with clinical outcome: a molecular and immunohistochemical analysis. Pathol Res Pract 1999; 195: 129-135..*

329. Brewster SF, Oxley JD, Trivella M, Abbott CD, Gillatt DA. *Preoperative p53, bcl-2, CD44 and E-Cadherin immunohistochemistry as predictors of biochemical relapse after radical prostatectomy. J Urol 1999; 161: 1238-1243.*

330. Quinn DI, Henshall SM, Head DR et al. *Prognostic significance of p53 nuclear accumulation in localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. Cancer Res 2000; 60: 1585-1594.*

331. Rakozy C, Grignon DJ, Sarkar FH, Sakr WA, Littrup P, Forman J. *Expression of bcl-2, p53 and p21 in benign and malignant prostatic tissue before and after radiation therapy. Mod Pathol 1998; 11: 892-899.*

332. Meyers FJ, Chi SG, Fishman JR, deVere White RW, Gummerlock PH. *p53 mutations in benign prostatic hyperplasia. J Natl Cancer Inst 1993; 85: 1856-1858.*

333. Yasunaga Y, Shim M, Fujita MO et al. *Different patterns of p53 mutations in prostatic intraepithelial neoplasia and concurrent carcinoma. Analysis of microdissected specimens. Lab Invest 1998; 78: 1275-1279.*

334. Bookstein R, MacGrogan D, Hilsenbeck SG, Sharkey F, Allred DC. *p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. Cancer Res 1993; 53: 3369-3373.*

335. Johnson MI, Robinson MC, Marsh C, Robson CN, Neal DE, Hamdy FC. *Expression of bcl-2, bax and p53 in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and localized prostate cancer: relationship with apoptosis and proliferation. Prostate 1998; 37: 223-229.*

336. Borre M, Stausbøl-Grøn B, Overgaard J. *p53 accumulation associated with bcl-2, the proliferation marker MIB-1 and survival in patients with prostate cancer subjected to watchful waiting. J Urol 2000; 164: 716-721.*

337. Bauer JJ, Sesterhenn IA, Mostofi FK, McLeod DG, Srivastava S, Moul JW. *Elevated levels of apoptosis regulator proteins p53 and bcl-2 are independent prognostic biomarkers in surgically treated clinically localized prostate cancer. J Urol 1996; 156: 1511-1516.*

338. Stricker HJ, Jay JK, Linden MD, Tamboli P, Amin MB. *Determining prognosis of clinically localized prostate cancer by immunohistochemical detection of mutant p53. Urology 1996; 47: 366-369.*

339. Zudaire JJ, Sánchez D, Arocena J et al. *Expresión de p53 y Ki-67 en piezas de prostatectomía radical. Relación con los datos clínico-patológicos y supervivencia. Actas Urol Esp 2000; 24: 307-313.*

340. Matsuura H, Hayashi N, Kawamura J, Shiraishi T, Yatani R. *Prognostic significance of Ki-67 expression in advanced prostate cancers in relation to disease progression after androgen ablation. Eur Urol 2000; 37: 212-217.*

341. Grignon DJ, Caplan R, Sarkar FH et al. *p53 status and prognosis of locally advanced prostatic adenocarcinoma: a study based on RTOG 8610. J Natl Cancer Inst 1997; 89: 158-165.*

342. Stapleton AMF, Timme TL, Gousse AE et al. *Primary human prostate cancer cells harboring p53 mutations are clonally expanded in metastases. Clin Cancer Res 1997; 3: 1389-1397.*

343. Meyers FJ, Gumerlock PH, Gil Chi S, Borchers H, Deitch AR, deVere White RW. *Very frequent p53 mutations in metastatic prostate carcinoma and in matched primary tumors. Cancer 1998; 83: 2534-2539.*

344. Eastham JA, Stapelton AMF, Gousse ARE et al. Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1111-1118.

345. Effert PJ, McCoy RH, Walther PJ, Liu ET. p53 gene alterations in human prostate carcinoma. *J Urol* 1993; 150: 257-261.

346. Mirchandani D, Zheng JP, Miller GJ et al. Heterogeneity in intratumor distribution of p53 mutations in human prostate cancer. *Am J Pathol* 1995; 147: 92-101.

347. Craig Hall M, Navone NM, Troncso P et al. Frequency and characterization of p53 mutations in clinically localized prostate cancer. *Urology* 1995; 45: 470-475.

348. Bergh J, Norberg T, Sjogren S, Lindgren A, Holmberg L. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nature Med* 1995; 1: 1029-1034.

349. Krupski T, Petroni GR, Frierson Jr. HF, Theodorescu D. Microvessel density, p53, retinoblastoma and chromogranin A immunohistochemistry as predictors of disease-specific survival following radical prostatectomy for carcinoma of the prostate. *Urology* 2000; 55: 743-749.

350. Stackhouse GB, Sesterhenn IA, Bauer JJ et al. p53 and bcl-2 immunohistochemistry in pretreatment prostate needle biopsies to predict recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol* 1999; 162: 2040-2045.

351. Bauer JJ, Srivastava S, Connelly RR et al. Significance of a familial history of prostate cancer to traditional prognostic variables, genetic biomarkers and recurrence after radical prostatectomy. *Urology* 1998; 51: 970-976.

352. Visakorpi T, Kallioniemi OP, Heikkinen A, Koivula T, Isola J. Small subgroup of aggressive highly proliferative prostatic carcinomas defined by p53 accumulation. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 883-887.

353. Masuda M, Takano Y, Iki M et al. Prognostic significance of Ki-67, p53 and bcl-2 expression in prostate cancer patients with lymph node metastases: a retrospective immunohistochemical analysis. *Pathol Int* 1998; 48: 41-46.

354. Bubendorf L, Tapia C, Gasser TC et al. Ki67 labelling index in core needle biopsies independently predicts tumor-specific survival in prostate cancer. *Hum Pathol* 1998; 29: 949-954.

355. Yaman Ö, Özdiler E, Orhan D et al. Immunohistochemical determination of p53 protein in prostatic cancer and prostatic intraepithelial neoplasms. *Urol Int* 1997; 58: 199-202.

356. Papadopoulos I, Rudolph P, Wirth B, Weichert-Jacobsen K. p53 expression, proliferation, marker Ki-S5, DNA content and serum PSA: possible biopotential markers in human prostatic cancer. *Urology* 1996; 48: 261-268.

357. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* 1999; 281: 1591-1597.

358. Uzoaru I, Rubenstein M, Mirochnik Y, Slobodskoy L, Shaw M, Guinan P. An evaluation of the markers p53 and Ki-67 for their predictive value in prostate cancer. *J Surg Oncol* 1998; 67: 33-37.

359. Berner A, Waere H, Nesland JM, Paus E, Danielsen HE, Fosså SD. DNA ploidy, serum prostate specific antigen, histological grade and immunohistochemistry as predictive parameters of lymph node metastases in T1-T3/M0 prostatic adenocarcinoma. *Br J Urol* 1995; 75: 26-32.

360. Navone NM, Troncoso P, Pisters LL et al. p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1657.

361. Henke RP, Krüger E, Ayhan N, Hübner D, Hammerer P, Huland H. Immunohistochemical detection of p53 protein in human prostatic cancer. *J Urol* 1994; 152: 1297-1301.

362. Leibovich BC, Cheng L, Weaver AL, Myers RP, Bostwick DG. Outcome prediction with p53 immunostaining after radical prostatectomy in patients with locally advanced prostate cancer. *J Urol* 2000; 163: 1756-1760.

363. Moul JW, Bettencourt MCC, Sesterhenn IA et al. Protein expression of p53, bcl-2 and Ki-67 (MIB-1) as prognostic biomarkers in patients with surgically treated, clinically localized prostate cancer. *Surgery* 1996; 120: 159-167.

364. Yang G, Stapleton AMF, Wheeler TM et al. Clustered p53 immunostaining: a novel pattern associated with prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 399-401.

365. Ruijter E, van de Kaa C, Aalders T et al. Heterogeneous expression of E-Cadherin and p53 in prostate cancer: clinical implications. *Mod Pathol* 1998; 11: 276-281.

366. Myers RB, Oelschläger D, Srivastava S, Grizzle WE. Accumulation of the p53 protein occurs more frequently in metastatic than in localized prostatic adenocarcinomas. *Prostate* 1994; 25: 243-248.

367. Matsushima H, Kitamura T, Goto T, Hosaka Y, Homma Y, Kawabe K. Combined analysis with bcl-2 and p53 immunostaining predicts poorer prognosis in prostatic carcinoma. *J Urol* 1997; 158: 2278-2283.

368. Wu J, Shao ZM, Shen ZZ et al. Significance of apoptosis and apoptotic-related proteins Bcl-2 and Bax in primary breast cancer. *Breast J* 2000; 6: 44-52.

369. Wehrli BM, Krajcski S, Gascoyne RD, Gilks CB. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, mcl-1 and bcl-X expression in ovarian surface epithelial tumors. *Int J Gynecol Pathol* 1998; 17: 255-260.

370. Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens C, Lee JJ, Levin B. bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1995; 55: 237-241.

371. Wilson GD, Saunders MI, Dische S, Richman PI, Daley FM, Bentzen SM. Bcl-2 expression in head and neck cancer; an enigmatic prognostic marker. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 49: 435-441.

372. Bubendorf L, Sauter G, Moch H et al. Prognostic significance of bcl-2 in clinically localized prostate cancer. *Am J Pathol* 1996; 148: 1557-1565.

373. English HF, Kyprianou N, Isaacs JT. Relationship between DNA fragmentation and apoptosis in programmed cell death in the rat prostate following castration. *Prostate* 1989; 15: 233-250.

374. Tsuji M, Murakami Y, Kanayama H, Sano T, Kagawa S. Immunohistochemical analysis of Ki-67 antigen and bcl-2 protein expression in prostate cancer: effect on neoadjuvant hormonal therapy. *Br J Urol* 1998; 81: 116-121.

375. Häussler O, Epstein JI, Amin MB, Heitz PU, Hailemariam S. Cell proliferation, apoptosis, oncogene and tumor suppressor gene status in adenosis with comparison to benign prostatic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Hum Pathol* 1999; 30: 1077-1086.

376. Stattin P, Damber J-E, Karlberg L, Nordgren H, Bergh A. Bcl-2 immunoreactivity in prostate tumorigenesis in relation to prostatic intraepithelial neoplasia, grade, hormonal status, metastatic growth and survival. *Urol Res* 1996; 24: 257-264.

377. Baltaci S, Orhan D, Özer G, Tolunay Ö, Gögüs O. Bcl-2 proto-oncogene expression in low- and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *BJU International* 2000; 85: 155-159.

378. Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 1996; 148: 1567-1576.

379. Shabaik AS, Krajewski S, Burgan A, Krajewski M, Reed JC. Bcl-2 protooncogene expression in normal, hyperplastic and neoplastic prostate tissue. *J Urol Pathol* 1995; 3: 17-27.

380. Denmeade SR, Lin XS, Isaacs JT. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate* 1996; 28: 251-265.

381. Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JJ, Buttyan R. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res* 1995; 55: 4438-4445.

382. Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E et al. Multiple bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with bax. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7834-7838.

383. Sullivan GF, Amenta PS, Villanueva JD, Alvarez CJ, Yang J-M, Hait WN. The expression of drug resistance gene products during the progression of human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1393-1403.

384. Cheng L, Pisansky TM, Sebo TJ et al. Cell proliferation in prostate cancer patients with lymph node metastasis: a marker for progression. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2820-2823.

385. Noordzij MA, Bogdanowicz J, van Krimpen C, van der Kwast TH, van Steenbrugge GJ. The prognostic value of pretreatment expression of androgen receptor and bcl-2 in hormonally treated prostate cancer patients. *J Urol* 1997; 158: 1880-1885.

386. Theodorescu D, Broder SR, Boyd JC, Mills SE, Frierson HF. p53, bcl-2 and retinoblastoma proteins as long-term prognostic markers in localized carcinoma of the prostate. *J Urol* 1997; 158: 131-137.

387. Scherr DS, Vaughan ED Jr., Wei J et al. Bcl-2 and p53 expression in clinically localized prostate cancer predicts response to external beam radiotherapy. *J Urol* 1999; 162: 12-17.

388. Myers RB, Grizzle WE. Changes in biomarker expression in the development of prostatic adenocarcinoma. *Biotech Histochem* 1997; 72: 86-95.

389. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Ala-Opas M, Kosma VM. Prognostic value and expression of p21 (waf1/cip1) protein in prostate cancer. *Prostate* 1999; 39: 8-15.

390. Shiraishi T, Watanabe M, Muneyuki T et al. A clinicopathological study of p53, p21 (WAF1/CIP1) and cyclin D1 expression in human prostate cancers. *Urol Int* 1998; 61: 90-94.

391. Sarkar FH, Li Y, Sakr WA et al. Relationship of p21^{waf1} expression with disease-free survival and biochemical recurrence in prostate adenocarcinomas (PCa). *Prostate* 1999; 40: 256-260.

392. Doglioni C, Pelosio P, Laurino L et al. p21/WAF1/CIP1 expression in normal mucosa and in adenomas and adenocarcinomas of the colon: its relationship with differentiation. *J Pathol* 1996; 179: 248-253.

393. Sasaki K, Sato T, Kurose A, Ikeda E. Immunohistochemical detection of p21waf1/cip1/sdi1 and p53 proteins in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections of colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 1996; 27: 912-916.

394. Dergham ST, Dugan MC, Joshi US et al. The clinical significance of p21 (WAF1/CIP1) and p53 expression in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 1997; 80: 372-381.

395. Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Ala-Opas M, Kosma VM. Expression of p21 (waf1/cip1) protein in transitional cell bladder tumors and its prognostic value. *Eur Urol* 1998; 34: 237-243.

396. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994; 369: 574-578.

397. Trotter MJ, Tang L, Tron VA. Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in human cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 1997; 24: 265-271.

398. Nadal A, Jares P, Cazorla M et al. p21^{WAF1/Cip1} expression is associated with cell differentiation but not with p53 mutations in squamous cell carcinoma of the larynx. *J Pathol* 1997; 183: 156-163.

399. Cox LS. Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21Cip1/WAF1/Sdi1. *J Pathol* 1997; 183: 134-140.

400. Yasui W, Akama Y, Kuniyasu H et al. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21/waf1/cip1 in non-neoplastic mucosa and neoplasia of the stomach: relationship with p53 status and proliferative activity. *J Pathol* 1996; 180: 122-128.

401. Elbendary AA, Cirisano FD, Evans Jr. AC et al. Relationship between p21 expression and mutation of the p53 tumor suppressor gene in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1571-1575.

402. Guo Y, Kyprianou N. Overexpression of transforming growth factor (TGF) β 1 type II receptor restores TGF- β 1 sensitivity and signaling in human prostate cancer cells. *Cell Growth Differ* 1998; 9: 185-193.

403. Parker SB, Eichele G, Zhang P et al. p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 1995; 267: 1024-1027.

404. Kallakury BVS, Figge J, Leibovich B et al. Increased bcl-2 protein levels in prostatic adenocarcinomas are not associated with rearrangements in the 2.8 kb major breakpoint region or with p53 protein accumulation. *Mod Pathol* 1996; 9: 41-47.

405. Knudson CM, Johnson GM, Lin Y, Korsmeyer SJ. Bax accelerates tumorigenesis in p53-deficient mice. *Cancer Res* 2001; 61: 659-665.

406. Piris MA, Pezzella F, Martínez-Montero J et al. p53 and bcl-2 expression in high-grade B-cell lymphomas: correlation with survival time. *Br J Cancer* 1994; 69: 337-341.

407. Kolár Z, Murray PG, Scott K, Harrison A, Vojtešek B, Dušek J. Relation of bcl-2 expression to androgen receptor, p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 status in prostate cancer. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2000; 53: 15-18.

408. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27/kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nature Med* 1997; 3: 227-230.

409. Ponce-Castañeda MV, Lee M, Latres E et al. p27/kip1: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumor. *Cancer Res* 1995; 55: 1211-1214.

410. Kawamata N, Morosetti R, Miller CW et al. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/kip1 in human malignancies. *Cancer Res* 1995; 55: 2266-2269.

411. Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM. Requirement of p27kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 1996; 272: 877-880.

412. St Croix B, Florenes VA, Rak JW et al. Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nature Med* 1996; 2: 1204-1210.

413. Tan P, Cady B, Wanner M et al. The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (t1a, b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57: 1259-1263.

414. Lloyd RV, Jin L, Qian X, Kulig E. Aberrant p27kip1 expression in endocrine and other tumors. *Am J Pathol* 1997; 150: 401-407.

415. Sánchez-Beato M, Sáez AI, Martínez-Montero JC et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 in lymphoid tissue: p27KIP1 expression is inversely proportional to the proliferative index. *Am J Pathol* 1997; 151: 151-160.

416. Levenberg S, Yarden A, Kam Z, Geiger B. p27 is involved in n-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry. *Oncogene* 1999; 18: 869-876.

417. De Marzo A, Meeker AK, Epstein JI, Coffey DS. Expression of the cell cycle inhibitor p27^{kip1} in normal, hyperplastic and neoplastic cells. *Am J Pathol* 1998; 153: 911-919.

418. Erdamar S, Yang G, Harper JW et al. Levels of expression of p27^{kip1} protein in human prostate and prostate cancer: an immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1999; 12: 751-755.

419. Fredersdorf S, Burns J, Milne AM et al. High level expression of p27(kip1) and cyclin d1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27(kip1) and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6380-6385.

420. Tsihlias J, Kapusta LR, DeBoer G et al. Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1} is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 542-548.

421. Lah TT, Kos J. Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. *Biol Chem* 1998; 379: 125-130.

422. Visscher DW, Sloane BF, Sameni M, Babiarz JW, Jacobson J, Crissman JJ. Clinicopathological significance of cathepsin B immunostaining in transitional neoplasia. *Mod Pathol* 1994; 7: 76-81.

423. Chapman HA, Riese RJ, Shi G. Emergin roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 63-88.

424. Riese RJ, Mitchell RN, Villadangos JA et al. Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J Clin Invest* 1998; 101: 2351-2363.

425. Riese RJ, Wolf PR, Brömme D et al. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 1996; 4: 357-366.

426. Johnson DE. Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia* 2000; 14: 1695-1703.

427. Shibata M, Kanamori S, Isahara K et al. Participation of cathepsins B and D in apoptosis of pc12 cells following serum deprivation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 199-203.

428. Vancompernelle K, Van Herreweghe F, Pynaert G et al. Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett* 1998; 438: 150-158.

429. Schmid KV, Helpap B, Totsch M et al. Immunohistochemical localization of chromogranins A and B and secretogranin II in normal, hyperplastic and neoplastic prostate. *Histopathology* 1994; 24: 233-239.

430. Khan A, Krishna M, Baker SP, Banner BF. Cathepsin B and tumor-associated laminin expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma. *Mod Pathol* 1998; 11: 704-708.

431. Myers RB, Grizzle WE. Biomarkers expression in prostatic intraepithelial neoplasia. *Eur Urol* 1996; 30: 153-166.

432. Nagle RB, Knox JD, Wolf C, Bowden GT, Cress AE. Adhesion molecules, extracellular matrix, and proteases in prostate carcinoma. *J Cell Biochem* 1994; 19: 232-237.

433. Sinha AA, Quast BJ, Wilson MJ, Reddy PK, Gleason DF, Sloane BF. Codistribution of procathepsin B and mature cathepsin B forms in human prostate tumors detected by confocal and immunofluorescence microscopy. *Anat Rec* 1998; 252: 281-289.

434. Smid L, Strojjan P, Budinha M et al. Prognostic value of cathepsins B, D and stefins A and B in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorrhinolaryngol* 254 (supl 1): S150-S153.

435. Budinha M, Strojjan P, Smid L et al. Prognostic value of cathepsins B, H, L, D and their endogenous inhibitors stefins A and B in head and neck carcinoma. *Biol Chem* 1996; 377: 385-390.

436. Kos J, Stabuc B, Schweiger A et al. Cathepsins B, H and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1815-1822.

437. Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H et al. Cathepsin B contributes to TNF- α -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 2000;106: 1127-1137.