



Universidad de Oviedo

**PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA Y
ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS**

**PRONÓSTICO DE LA EXPRESIÓN DE LAS
METALOPROTEINASAS 1, 2, 7, 9, 13, 14 Y DE SUS
INHIBIDORES TISULARES 1, 2 Y 3 EN LAS CÉLULAS
TUMORALES, ESTUDIADA MEDIANTE
MICROMATRICES TISULARES EN PIEZAS DE
PROSTATECTOMÍA RADICAL.**

Priscila Benito García



Universidad de Oviedo

**PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA Y
ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS**

**PRONÓSTICO DE LA EXPRESIÓN DE LAS
METALOPROTEINASAS 1, 2, 7, 9, 13, 14 Y DE SUS
INHIBIDORES TISULARES 1, 2 Y 3 EN LAS CÉLULAS
TUMORALES, ESTUDIADA MEDIANTE MICROMATRICES
TISULARES EN PIEZAS DE PROSTATECTOMÍA RADICAL**

Autor

Priscila Benito García

Director:

Dr. Rodrigo Gil Ugarteburu

Director:

Dr. Safwan Escaf Barmadah



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
<p>Español/Otro Idioma: Valor pronóstico de la expresión de las metaloproteinasas 1, 2, 7, 9, 13, 14 y de sus inhibidores tisulares 1, 2 y 3 en las células tumorales, estudiada mediante micromatrices tisulares en piezas de prostatectomía radical</p>	<p>Inglés: Prognostic value of the expression of metalloproteinases 1,2, 7, 9, 13, 14 and their tissue inhibitors 1, 2 and 3 in tumour cells studied by microarrays in radical prostatectomy specimens</p>
2.- Autor	
<p>Nombre: PRISCILA BENITO GARCIA</p>	<p>DNI/Pasaporte/NIE:</p>
<p>Programa de Doctorado: INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚGICAS</p>	
<p>Órgano responsable: INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚGICAS</p>	

RESUMEN (en español)

INTRODUCCION

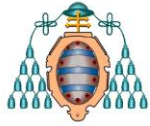
En los últimos años se han desarrollado distintos sistemas de predicción de la evolución de los pacientes con cáncer de próstata sometidos a prostatectomía radical, pero en muchas ocasiones son difíciles de aplicar o no tienen fiabilidad elevada. Se hace necesario desarrollar marcadores que permitan identificar la evolución de la neoplasia prostática. El desarrollo de las nuevas técnicas de análisis molecular permite estudiar múltiples factores moleculares en poco tiempo y con bajo coste. Existen evidencias experimentales y clínicas de la influencia de factores expresados en las células tumorales en la carcinogénesis en diversos tumores, que pueden estar ligados a la progresión y a la producción de metástasis a distancia. Las MMPs y TIMPs han demostrado su importancia en este sentido, en distintos tumores, incluido el cáncer de próstata. Basándonos en estos datos postulamos que la detección de la expresión de metaloproteinasas 1, 2, 7, 9, 13, 14 y de sus inhibidores tisulares 1, 2 y 3 en las células tumorales de cáncer de próstata, estudiada mediante micromatrices tisulares en piezas de prostatectomía radical, puede tener valor pronóstico en cuanto a la supervivencia de estos pacientes.

MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio retrospectivo y ciego respecto a las determinaciones histológicas de la expresión de metaloproteinasas 1, 2, 7, 9, 11, 13, 14 y de sus inhibidores tisulares 1, 2 y 3 en las células tumorales de cáncer de próstata de piezas de prostatectomía radical en pacientes con cáncer de próstata, PINAG y HBP en 133 casos seleccionados de cáncer de adenocarcinoma de próstata localizados clínicamente sometidos a prostatectomía radical, 20 con PIN y 50 con HBP

RESULTADOS

Tras el análisis comprobamos que la expresión de MMP/TIMP en las células tumorales fue globalmente más alta en los carcinomas de próstata que en los tejidos de la próstata benigna. Se evidenció una variabilidad en la expresión de MMP/TIMP por las células tumorales en los carcinomas de próstata, lo cual apoya la heterogeneidad biológica del cáncer de próstata. En las células tumorales, TIMP-1 se asoció significativamente y directamente con el grado tumoral. Se objetivó una relación directa entre la expresión de MMP-11 y MMP-13, e inversa de MMP-2, con la recidiva bioquímica tras la prostatectomía radical. Pudimos identificar dos grupos bien definidos de expresión de MMPS y TIMPS en las células tumorales con un patrón evolutivo específico.



RESUMEN (en Inglés)

INTRODUCTION

In recent years, different systems have been developed to predict the outcome of patients undergoing radical prostatectomy, which often are difficult to apply or do not have an excessively high reliability. It is necessary to develop markers to identify properly the evolution of prostate neoplasm. The development of new techniques of molecular analysis allows the study of multiple molecular factors in a short time and low cost. There is experimental and clinical evidence of the influence of factors expressed in tumor cells on carcinogenesis in various tumors, which may be more linked to the progression and production of metastases. MMPs and TIMPs have demonstrated their critical role in this sense in different tumors, including prostate adenocarcinoma. Based on these data, we postulate that the detection of the expression of metalloproteinases 1, 2, 7, 9, 11, 13, 14 and of their tissue inhibitors 1, 2 and 3 in prostate cancer tumor cells studied by tissue microarrays in radical prostatectomy specimens may have a prognostic value in terms of the survival of these patients.

MATERIAL AND METHODS

We performed a retrospective and blind study to the histological findings of the expression of metalloproteinases 1, 2, 7, 9, 11, 13, 14 and of their tissue inhibitors 1, 2 and 3 in tumor cells of prostate cancer pieces of radical prostatectomy in patients with prostate cancer, PIN and BPH in 133 selected cases of clinically localized adenocarcinoma who underwent radical prostatectomy, 20 with PIN and 50 with BPH.

RESULTS

After analysis we found that the expression of MMP / TIMP in tumor cells was generally higher in prostate carcinomas than in benign prostate tissues. Variability in MMP / TIMP expression was evidenced by tumor cells in prostate carcinomas, which supports the biological heterogeneity of prostate cancer. In tumor cells, TIMP-1 was significantly and directly associated with tumor grade. A direct relationship between the expression of MMP-11 and MMP-13, and inverse of MMP-2, was observed with biochemical recurrence after radical prostatectomy. We were able to identify two well-defined groups of MMPS and TIMPS expression in tumor cells with a specific evolutionary pattern.

*A mi familia
y a mis mentores*

AGRADECIMIENTOS

Es verdaderamente difícil para mí en este momento mostrar mi gratitud a todas las personas que han formado parte de este proyecto, pues sin duda me dejaría a alguna.

Sois muchos los que habéis colaborado a que esta Tesis sea por fin una realidad, por ello espero poder mostraros pronto, personalmente, mis más sincero agradecimiento.

Tengo que destacar, sin duda, a mis Directores, a mis compañeros de trabajo, al personal del laboratorio, y a los pacientes participantes que han participado en este estudio.

Por otro lado, no puedo olvidarme de mi familia y mis amigos, por haber estado ahí en los momentos de crisis.

A todos, GRACIAS.

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	13
LISTADO DE TABLAS	15
LISTADO DE FIGURAS	17
INTRODUCCIÓN	21
HISTORIA NATURAL DE LA HIPERTROFIA DE PROSTATA (H. B. P.)	21
EMBRIOLOGÍA	21
CRECIMIENTO Y DEPENDENCIA HORMONAL	24
FACTORES REGULADORES DEL CRECIMIENTO PROSTÁTICO	25
DEFINICIÓN DE HIPERTROFIA PROSTÁTICA BENIGNA (H.B.P.)	26
HISTOLOGÍA DE LA HIPERTROFIA PROSTÁTICA BENIGNA	27
EPIDEMIOLOGÍA DE LA HIPERTROFIA PROSTÁTICA BENIGNA	28
CÁNCER DE PRÓSTATA	30
HISTOPATOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA	30
EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA	35
ETIOLOGÍA Y GENÉTICA	38
EL ANTIGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO (PSA)	41
CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS	41
FORMAS DEL PSA	42
HBP Y PSA	44
EL PSA COMO PRUEBA DE DETECCIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA	44
OTROS PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL PSA	45
FACTORES PRONÓSTICOS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA	49
CATEGORÍA I DE FACTORES PRONÓSTICOS	50
CATEGORÍA II DE FACTORES PRONÓSTICOS	55
CATEGORÍA III DE FACTORES PRONÓSTICOS	58
LAS METALOPROTEINASAS DE MATRIZ	67
EXPERIENCIA PREVIA DE NUESTRO GRUPO	72
HIPÓTESIS DE TRABAJO	81
OBJETIVOS	85

MATERIAL Y MÉTODOS	89
PACIENTES Y MUESTRAS TISULARES	89
PACIENTES	89
MUESTRAS TISULARES	94
MÉTODOS	96
SELECCIÓN DE BLOQUES DE PARAFINA PARA EL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	96
ELABORACIÓN DE LAS MALLAS DE TEJIDO (<i>TISSUE ARRAYS</i>)	96
ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO	99
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	101
CONSENTIMIENTO INFORMADO	103
RESULTADOS	107
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	107
ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	112
ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN GLOBAL DE LAS MMPS Y TIMPS EN PATOLOGÍA BENIGNA DE LA PRÓSTATA Y EN CANCER DE PRÓSTATA	113
EXPRESIÓN GLOBAL DE LAS MMPS Y SUS INHIBIDORES EN CARCINOMAS PROSTÁTICOS	115
RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GLOBAL DE LAS MMPS Y TIMPS EN CÉLULAS TUMORALES Y CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS EN CANCER DE PRÓSTATA	117
RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GLOBAL DE MMPS Y TIMPS EN CELULAS TUMORALES Y LA RECIDIVA BIOQUÍMICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA LOCALIZADO	118
IDENTIFICACION DE DIFERENTES FENOTIPOS EN LA EXPRESIÓN DE MPPS Y TIMPS EN CÁNCER DE PRÓSTATA	120
DISCUSIÓN	127
ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE MMPS Y TIMPS EN PATOLOGÍA BENIGNA Y EN CANCER DE PRÓSTATA	131
EXPRESIÓN GLOBAL DE LAS MMPS Y SUS INHIBIDORES EN CARCINOMAS PROSTÁTICOS	133
RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GLOBAL DE LAS MMPS Y TIMPS EN CÉLULAS TUMORALES Y CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS EN CANCER DE PRÓSTATA	135
RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE MMPS Y TIMPS EN CELULAS TUMORALES Y LA RECIDIVA BIOQUÍMICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA LOCALIZADO	137
IDENTIFICACION DE FENOTIPOS EN LA EXPRESIÓN DE MPPS Y TIMPS EN CÁNCER DE PRÓSTATA	140
CONCLUSIONES	143
BIBLIOGRAFÍA	147

LISTADO DE ABREVIATURAS

AR	Receptor androgénico
Arg	Arginina
CaP	Cáncer de próstata
CMI (MIC)	Células mononucleares inflamatorias
cTNM	Estadio clínico
DE	Desviación estándar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Especificidad
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EMPRIN	Inductor extracelular de MMP
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con inmunofluorescencia
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
Gy	Grey
HBP	Hiperplasia benigna de próstata
HT	Hormonoterapia
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL	Interleuquina
MMP	Metaloproteinasas de matriz
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MT-MMP	Metaloproteinasas de matriz de membrana
PAR	Receptor activado de la proteasa
PIN	Neoplasia intraprostática
PINAG	Neoplasia intraprostática de alto grado
PR	Prostatectomía radical
PSA	Antígeno prostático específico

PSAD	Densidad de PSA
pTNM	Estadio patológico RT Radioterapia
RTUp	Resección transuretral de próstata
S	Sensibilidad
Ser	Serina
TIMP	Inhibidor tisular de las MMP
TGF	Factor de crecimiento transformante
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

LISTADO DE TABLAS

Tabla I 1: TNM Próstata 2009

Tabla I 2: Patrones de Gleason

Tabla I 3. Clasificación de las metaloproteasas.

Tabla M1: Rango de edad de los pacientes incluidos

Tabla R1. Características de los pacientes

Tabla R2: Expresión de las MMPs y TIMPs en las muestras de patología prostática benigna y en carcinoma prostático. Los datos se muestran como número de casos y porcentaje de casos entre paréntesis.

Tabla R3. Valores de inmunotinción para cada proteína analizada.

Tabla R4: Relación entre la expresión de TIMP-1 por las células tumorales y el grado histológico

TABLA R5: Análisis de Cox univariante (HR) y multivariante (RR) de la relación entre la expresión de MMPS y TIMPSy la supevivencia libre de recidiva. (** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$)

LISTADO DE FIGURAS

Figura I 1. Estructura básica de las metaloproteasas

Figura. R1: Programa específico de software que calcula automáticamente el porcentaje de células inmunoteñidas.

Figura R2: Ejemplo de expresión de MMP-1 en patología prostática benigna y en cáncer de próstata (400x)

Figura R3: Probabilidad de recidiva bioquímica en función de la expresión de MMP-13 en las células tumorales ($p=0.02$). MMP-13 negativa (azul), MMP-13 positiva (rojo).

Figura R4: Probabilidad de recidiva bioquímica en función de la expresión de MMP-2 por células tumorales en pacientes con cáncer de próstata.

Fig.R5: Representación gráfica del dendrograma para valores globales (A) y en las células tumorales (B).

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

HISTORIA NATURAL DE LA HIPERTROFIA DE PROSTATA (H. B. P.)

Embriología

La próstata es un órgano glandular, impar, con un componente fibro-muscular importante, de unos 20-30 gramos de peso y situado en la cavidad pélvica.

El aparato urogenital proviene del mesodermo intermedio, pliegue mesodérmico situado a lo largo de la pared posterior de la cavidad abdominal. Los conductos excretores del aparato urogenital van a desembocar en una cavidad común denominada cloaca.

El desarrollo de la próstata puede dividirse en un período morfogenético y otro de diferenciación funcional. El primero de ellos se extiende desde la edad fetal hasta la pubertad e incluye tres fases: en la

primera se produce la determinación del *campo morfogenético prostático*, en la segunda la *histodiferenciación*, y en la tercera, la *citodiferenciación*.

En base a la evolución del seno urogenital, tubo endodérmico del que se desarrollarán posteriormente todas las estructuras del aparato urogenital, el campo morfogenético va a situarse en la región del seno urogenital, entre la futura vejiga y la uretra perineal^(Hamilton WJ, Interamericana 1973. Mirapeix RM, Rev Urol 2003). El proceso mediante el cual algunas células del seno urogenital se desarrollan para dar lugar a los túbulos prostáticos, se denomina *inducción de la próstata* y depende principalmente de la existencia de andrógenos, los cuales son capaces de regular la expresión de diferentes factores de crecimiento^(Cunha CR, A 1996. Thomson AA, Reproduction 2001).

Tras la fase de la inducción y después de la evaginación de la primera yema epitelial, comienza el período conocido como histodiferenciación, donde también juegan un papel importante los andrógenos y los factores de crecimiento, favoreciendo la proliferación y ramificación de las yemas prostáticas sólidas.

Por otra parte, para impedir un crecimiento desmesurado existen los denominados factores inhibidores del crecimiento.

En embriología clásica, la porción glandular de la próstata se forma a partir de cinco grupos tubulares independientes que dan lugar a la formación de cinco lóbulos prostáticos: medio, anterior, posterior y laterales^(Lowsley Am J Anat 191); en éste desarrollo también interviene una estructura de origen controvertido, el utrículo prostático, situado entre la desembocadura de los conductos eyaculadores, por delante del lóbulo posterior y por debajo del lóbulo medio; para unos su origen es exclusivamente mesodérmico mientras que para otros procede también

de los conductos mesonéfricos y de material endodérmico del seno urogenital^(Glennister TW J Anat 1962).

La tercera fase o citodiferenciación empieza en la zona de los cordones prostáticos próxima a la uretra y continúa, distalmente, hacia la punta de los cordones sólidos y supone la diferenciación de estos cordones respecto a los conductos canalizados revestidos de epitelio columnar y una capa subyacente de células basales y en la que juega un papel fundamental uno de los factores intrínsecos de las células epiteliales, el homeobox *Hoxb-13*^(Thomson AA, Reproduction 2001. Economides KD, Development 2003). En este período se diferencian 3 fases^(Xia T, Pediatric pathology 1990) : la primera, entre las semanas 20 y 30 de desarrollo, se caracteriza por la aparición de las glándulas como brotes sólidos de epitelio columnar o cilíndrico; la segunda, entre las semanas 31 y 36, se observan los acinos glandulares y los conductos en las zonas interna y externa de la próstata; por último, en la tercera fase, entre las semanas 37 y 42, se produce la maduración de las agrupaciones acino-tubulares organizándose en agrupaciones lobulares.

El mesénquima derivado del mesodermo parietal da lugar al tejido conectivo y a las fibras musculares lisas.

Crecimiento y dependencia hormonal

El crecimiento y la diferenciación de la próstata depende de factores extracelulares como las hormonas sexuales masculinas, los andrógenos, y también de factores peptídicos.

Por un lado interviene la regulación endocrina del eje hipotálamo-hipófiso-testicular, pero por otra parte y dentro de la propia glándula existe un control añadido por mecanismos paracrinós y autocrinós, llevados a cabo por las células del estroma y las células del epitelio glandular.

El hipotálamo sintetiza la *hormona liberadora de gonadotropinas* (Gn-RH), que actúa sobre la hipófisis; ésta responde liberando las gonadotropinas *hormona luteinizante* (LH) y *hormona folículo-estimulante* (FSH). Estas actúan sobre el testículo, induciendo la producción y secreción de hormonas sexuales masculinas (andrógenos) que van a la próstata, donde ejercen el control de su desarrollo y función.

Además de los andrógenos, otras hormonas tienen acción directa sobre la próstata: la *prolactina* (PRL) estimula la proliferación y diferenciación de líneas celulares derivadas de la próstata humana y potencia la acción androgénica ^(July LV, Prostate 2000) o la *hormona del crecimiento* (GH) detectándose un elevado número de sus receptores en la próstata.

Factores reguladores del crecimiento prostático

La glándula prostática está compuesta por una región epitelio-glandular y una región estromal o fibromuscular; ambos compartimentos se comunican entre sí intercambiando señales reguladoras que controlan el crecimiento, diferenciación y funcionalidad de la próstata y generando también modos de actuación diferentes al efecto endocrino de los andrógenos, que sólo no parecen suficientes para el correcto funcionamiento de la glándula.

Parece que los efectos de los andrógenos o de la dihidrotestosterona (DHT) estarían mediados por una serie de factores proteicos denominados *factores de crecimiento* (Cunha GR, Endocrinology 1991): *factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), citocinas, interleucinas (IL), factor de crecimiento transformante (TGF-β),* y péptidos secretados por las células neuroendocrinas (*cromogranina A, calcitonina, somatostatina, serotonina, antígeno prostático específico*).

Definición de Hipertrofia Prostática Benigna (H.B.P.)

El nombre de próstata y su descripción anatómica se deben a Herófilo de Calcedonia, padre de la anatomía y representante de la medicina helenística alejandrina. En el Renacimiento se produce un nuevo interés por esta glándula a través de Vesalio y sus seguidores, pero es en la Ilustración cuando se establece con claridad la interrelación entre el crecimiento prostático y algunas afecciones como las litiasis y la retención de orina (Lawson RK, Editorial médica Panamericana 1993).

El empuje nosológico de la hipertrofia prostática benigna se debe al progreso quirúrgico ya que son los cirujanos los que demuestran que la causa del aumento de tamaño de la glándula prostática es una estructura que puede enuclearse, el “adenoma”, y son los cirujanos de la escuela francesa de Albarrán a principios del siglo XX los que consiguen la identificación nosológica precisa de la hipertrofia prostática benigna (Legueu F, Salvat editores 1927). La definición nosológica, pues, está basada en el progreso quirúrgico, la patología macroscópica, la identificación del adenoma, su crecimiento y consecuencias obstructivas, y en el argumento anatomo-clínico y funcional de que su extirpación conduce a la mejoría y curación del paciente.

No existe un volumen prostático mínimo para hablar de hipertrofia prostática; los estudios poblacionales hablan de un volumen de próstata normal de un adulto de 40 años, de unos 30 cm³ que se va incrementando con la edad.

Histología de la Hipertrofia Prostática Benigna

La hipertrofia prostática benigna es un término clínico, que se corresponde con una lesión anatomopatológica específica denominada *hiperplasia nodular* ^(Moore RA, J Urol 1943), entendiéndose por este término a la expansión nodular del componente glandular, estromal o de ambos, en proporciones variables.

Macroscópicamente, la glándula hiperplásica adquiere una apariencia multinodular, y los nódulos, de aspecto blanquecino y esponjoso y de crecimiento estromal, son firmes y homogéneos, disponiéndose alrededor de la uretra proximal.

Los cambios microscópicos afectan a distintos tipos celulares; el signo histológico más precoz lo constituyen los nódulos del tejido conectivo submucoso alrededor de la uretra, denominados *nódulos estromales*, formados por estroma fibrovascular, rodeado por capilares revestidos de células fusiformes de núcleos blandos y escaso citoplasma ^(Franks LM, Ann R Coll Surg England 1954). El patrón predominantemente epitelial se encuentra en la zona de transición y periuretral ^(McNeal JE, Am J Surg Pathol 1988. McNeal JE, Invest Urol 1978) y está formado por elementos ductoacinares ramificados, entremezclados con elementos estromales. El epitelio contiene una doble capa de células secretoras orientadas hacia el lumen, altas y columnares, descansando sobre una capa de células basales (no siempre evidentes), de formas cúbicas a ovaladas. El citoplasma de la célula epitelial es abundante y claro, los núcleos uniformes; es frecuente encontrar concreciones eosinofílicas y cuerpos amiláceos.

Epidemiología de la Hipertrofia Prostática Benigna

Frente a los procesos o enfermedades fatales en los que prima el estudio de la incidencia (número de personas afectadas por 100.000 habitantes por año), en las entidades de curso benigno como la hipertrofia prostática benigna, el parámetro epidemiológico más importante es el de la prevalencia (número de casos por 100.000 habitantes en una fecha objetivo determinada).

Los estudios epidemiológicos de la hipertrofia prostática benigna tienen como interés conocer los rangos de normalidad de los síntomas, tamaños prostáticos y valores del flujo miccional, y establecer cohortes de población enferma, impacto poblacional, historia natural e identificación de factores de riesgo. La mayoría de los estudios se dirigen a la caracterización clínica de los síntomas del tracto urinario inferior mediante la aplicación de diferentes cuestionarios (Boyarsky, Internacional Prostate Symptom Store –IPSS- o el cuestionario danés -DAN-PSS-). El estudio epidemiológico clave fue desarrollado por Barry y colaboradores ^(Barry MJ, Urol Clin North Am 1990) reuniendo datos de cinco estudios que indicaban que ningún hombre menor de 30 años presentaba indicios de hipertrofia prostática benigna y que la prevalencia de la enfermedad aumentaba en cada grupo de edad hasta alcanzar un valor máximo en el grupo entre los 80 y los 90 años.

En cuanto a la clínica, en casi todos los estudios realizados, se objetiva que la prevalencia de la sintomatología moderada a severa, se

incrementa con la edad (Girman CJ, J Urol 1995. Chute CG, J Urol 1993, Moreno Sierra J, Caracterización clínica y epidemiológica de los síntomas del tracto urinario... CCAA Madrid)

En lo que se refiere a la calidad de vida, existe una correlación entre la afectación de ésta percibida por el paciente y la sintomatología miccional (Girman CJ, J Urol 1995. Chute CG, J Urol 1993), de forma que se puede afirmar que los pacientes mayores tienen una peor percepción de su calidad de vida que los pacientes jóvenes, independientemente del nivel cultural, racial o geográfico (Salinas AS, Arch Esp Urol 2000. Girman CJ, Urology 1998).

Otro aspecto de los estudios epidemiológicos es el tamaño de la próstata (evaluado en general mediante ecografía transrectal). En términos globales, en varios estudios se observó un aumento del volumen prostático total de alrededor de 25 ml en hombres de 30 a 39 años, de 35 a 45 ml en hombres de 70 a 79 años, mientras que el volumen de la zona de transición aumentó de 15 a 25ml en el mismo período. (Roehrbom CG J Urol 2000. Overland G Eur Urol 2001. Chicharro Molero JA, J Urol 1998)

Por lo que se refiere a los indicadores de obstrucción infravesical, ésta sólo puede evaluarse mediante los estudios de presión-flujo; en general, se acepta que una velocidad máxima de flujo inferior a 10 ml/seg se asocia a una elevada probabilidad de obstrucción y que ésta velocidad máxima disminuye con la edad en hombres y en mujeres, según el Olmsted County Study (Girman CJ, J Urol 1993)

CÁNCER DE PRÓSTATA

Histopatología del cáncer de próstata

El cáncer de próstata es una neoplasia maligna glandular, cuyo origen tiene lugar en las células precursoras *stem cell* que se diferencian a células secretoras. (Pardal R, Nat rev Cancer. 2003:895-902)

Las células basales de la glándula prostática normal tienen escaso citoplasma y la mayoría tienen receptores de factores de crecimiento producidos por el estroma prostático, carecen de receptores androgénicos y expresan Bcl-2 (familia de proteínas que juegan un importante papel en el control apoptótico), son consideradas como células precursoras, algunas de ellas tienen receptores androgénicos (células progenitoras intermedias), con capacidad de diferenciación hacia células luminales secretoras, con receptores androgénicos en todas ellas. Serían estas células intermedias las dianas de los agentes cancerígenos en la próstata humana, que representarían un mínimo porcentaje de masa tumoral. (Maitland NJ, BJU International. 2005)

Cada vez parecen más evidentes los factores genéticos que predisponen a una mayor susceptibilidad al desarrollo del cáncer, y que cambios celulares oxidativos, elementos ambientales y dietéticos son

factores cancerígenos. Los cambios inflamatorios y el cáncer se relacionan con la liberación de radicales de oxígeno y nitrógeno, de forma que los factores dietéticos que producen estrés oxidativo podrían producir lesión celular y regeneración, pudiendo conducir, si esta acción es reiterativa, a una expansión de las células progenitoras intermedias. (Gonzalbo ML, J. Urol. 2003)

Según ésta teoría, los cambios reunidos bajo la denominación de *atrofia inflamatoria proliferativa* se están considerando como una de las posibles lesiones precursoras de la neoplasia intraepitelial. (De Marzo AM. Urology. 2005)

La neoplasia intraepitelial prostática (PIN) incluye una serie de lesiones caracterizadas por la atipia nuclear de las células luminarias, con persistencia de células del estrato basal y sin evidencia de ruptura de la membrana basal. Existe evidencia de la transformación del epitelio secretor normal a epitelio con atrofias y los cambios de PIN de alto grado (con cambios más prominentes) (De Marzo AM. Urology.2005). Además, se considera que la PIN de alto grado (PINAG) es lesión precursora del cáncer de próstata en base a su paralelismo epidemiológico (ambos se incrementan con la edad), topográfico (proximidad de ambas lesiones en las piezas), morfológico (atipia e irregularidad de los núcleos, pérdida de células basales) y genético-moleculares. (Gonzalbo ML. J. Urol. 2003)

En cuanto al adenocarcinoma de próstata, el patrón más frecuente está constituido por una proliferación microglandular monoestratificada, con ausencia de las células basales, y compuesto por células neoplásicas de prominentes nucléolos y con fenotipo de célula secretora; la progresiva desdiferenciación de esta neoformación puede dar lugar a la formación de estas microglándulas en áreas cribosas, masas

sólidas o nódulos con necrosis central o cordones de células irreconocibles.

La primera estación de invasión del cáncer lo constituye el estroma, y para que esto ocurra son imprescindibles los siguientes pasos:

a) ***Pérdida de adhesión intercelular***, gracias a la anómala expresión de las moléculas de adhesión, sobre todo la E-cadherina y la N-cadherina.

(Tomita K. Cancer Res. 2000)

b) ***Degradación de la membrana basal.***

c) ***Capacidad de las células neoplásicas para subsistir en un medio desconocido***

Para evaluar el grado de invasión estromal y la progresiva pérdida del patrón glandular se ha adoptado un sistema de gradación, aceptado por la Organización mundial de la Salud (OMS) y revisado en el año 2005 por la Sociedad Internacional de Uropatólogos (SIUP), el sistema de gradación Gleason ^(Epstein JI, Am J Surg Pathol. 2005) :

Patrón 1: glándulas pequeñas, apretadas, muy bien diferenciadas, uniformes, en masas circunscritas.

Patrón 2: similar al patrón 1, peor con cierta variación del diámetro glandular., y más atipia en las células individuales. El patrón cribiforme puede estar presente, siendo circunscrito, pero más laxo.

Patrón 3: progresiva disgregación de las microglándulas, mayor irregularidad e incremento del estroma interglandular.

Patrón 4: fusión glandular, sin estroma intermedio, o zonas cribosas con mala delimitación del contorno.

Patrón 5: glándulas con necrosis central o cordones celulares infiltrantes, poca o ninguna diferenciación glandular.

La gradación se establece considerando el patrón principal primario y el secundario, a través de la suma o *score* de los mismos ^(Sobin LH et al. 2009). El patrón terciario es el tercer grado más prevalente en la biopsia. Es el tercer patrón siempre que sea de más grado que los otros dos y que constituya <5% del tumor (si es >5% pasaría a ser patrón secundario).

Existe una correlación de los patrones de Gleason tanto con el volumen tumoral como con el porcentaje de metástasis al momento del diagnóstico, de forma que para la puntuación Gleason de 2 a 5 el riesgo de presentar metástasis es del 14%, para los Gleason 6 es el 32%, para los Gleason 7, un 50%, para los 8, un 75%, y para los 9 y 10, prácticamente el 100% ^(Sebo TJ. J Urol. 2000). También existe correlación con el tiempo libre de enfermedad a cinco años, de forma que las puntuaciones bajas de Gleason presentan una supervivencia del 90-100%, mientras que los Gleason 8-10 rondan el 40% ^(Epstein JI. AM J Surg Pathol. 1996).

Sin embargo, y a pesar de la importancia del sistema Gleason, el factor pronóstico más importante sigue siendo el estadio o extensión del tumor, y el mejor método para evaluarlo, el sistema TNM de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) ^(Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C. TNM Classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 7th Ed. Wiley-Blackwell 2009: 243-248)

En este sistema, las categorías T se correlacionan con la incidencia de metástasis ganglionar (1% para los T2a, 25% para los T2b-c) y con la

supervivencia libre de enfermedad a 10 años (67% para los pT2 y 58% para los pT3)^(Donohue RE, Urology. 1982 y Theiss M. Prostate. 1995)

Tabla 2: TNM Próstata 2009

T: Tumor primario
Tx El tumor primario no puede evaluarse
T0 NO hay evidencia de tumor primario
T1 Tumor no evidente clínicamente, no palpable ni visible mediante técnicas e imagen <ul style="list-style-type: none"> • T1a Tumor detectado como hallazgo histológico fortuito en una extensión menor o igual al 5% del tejido reseado • T1b Tumor detectado como hallazgo histológico fortuito en una extensión mayor del 5% • T1c Tumor identificando mediante biopsia con aguja (por ejemplo a consecuencia de un PSA elevado)
T2 Tumor confinado a la próstata <ul style="list-style-type: none"> • T2a Tumor que afecta la mitad de un lóbulo o menos • T2b Tumor que afecta a más de la mitad de un lóbulo, pero no ambos lóbulos • T2c Tumor que afecta ambos lóbulos
T3 Tumor que se extiende a través de la cápsula prostática <ul style="list-style-type: none"> • T3a Extensión extracapsular (unilateral o bilateral) incluyendo la participación (microscópica) del cuello vesical • T3b Tumor que invade las vesículas seminales
T4 Tumor que invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales: esfínter externo, recto, músculos elevadores del ano y/o pared pélvica
N: Ganglios linfáticos regionales
Nx Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
N0 Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales
N1 Metástasis en ganglios linfáticos regionales
M: Metástasis
Mx No se pueden valorar las metástasis
M0 NO hay metástasis a distancia
M1 Metástasis a distancia <ul style="list-style-type: none"> • M1a Ganglios linfáticos no regionales • M1b Hueso/s • M1c Otra/s localización/es

Epidemiología del cáncer de próstata

Hoy en día, el cáncer de próstata se considera uno de los problemas médicos más importantes a los que se enfrenta la población masculina. Desde 1985, se ha producido un ligero aumento del número de muertes por cáncer de próstata en la mayoría de las naciones, incluso en países o regiones en los que el cáncer de próstata no es frecuente ^(Quinn M, BJU Int 2002)

Incidencia

Según el programa *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER), dependiente del *National Cancer Institute* (NCI), en los Estados Unidos de Norteamérica (EE.UU.), la tasa de incidencia en el año 2002 fue de 161,2 casos/100.000 hombres para todas las razas, que al ajustar a la población estándar se obtiene una incidencia de 117,7 casos/100.000 (<http://seer.cancer.gov>.)

En Europa, el cáncer de próstata es la neoplasia sólida más frecuente, con una incidencia de 214 casos por 1.000 varones, superando en número a los cánceres de pulmón y colorrectal ^(Boyle P, Ann Oncol 2005). Además, el cáncer de próstata constituye actualmente la segunda causa más frecuente de mortalidad por cáncer en los varones ^(Jemal A, CA Cancer J Clin 2008)

En España se ha estimado una incidencia de 45,33 y 28,26 respectivamente (<http://WWW-dep.iarc.fr/eucan/eucan.htm>), según datos recogidos en la base de datos EUCAN, dependiente de la European Network of Cancer Registries (ENCR).

El cáncer de próstata afecta a los varones ancianos con mayor frecuencia que a los jóvenes. Por consiguiente, supone un mayor problema de salud en los países desarrollados, ya que cuentan con una mayor proporción de varones ancianos. Así, alrededor del 15 % de los cánceres en varones son cáncer de próstata en los países desarrollados, en comparación con el 4 % en aquellos en vías de desarrollo (Parkin DM. Eur J Cancer 2001). Conviene señalar que hay notables diferencias regionales en las tasas de incidencia de cáncer de próstata. Por ejemplo, en Suecia, donde existe una esperanza de vida prolongada y la mortalidad por enfermedades relacionadas con el tabaco es relativamente pequeña, el cáncer de próstata es la neoplasia maligna más frecuente en los varones, de modo que representó el 37 % de todos los casos nuevos de cáncer en 2004 (Cancer incidence in Sweden 2004. The National Board of Health and Welfare: Stockholm.http://sjp.sagepub.com/cgi/reprint/34/67_suppl/3.pdf Update)

Mortalidad

Utilizando las mismas fuentes de información, la mortalidad por cáncer de próstata en EE.UU. en el año 2002 para todas las razas fue de 28,1/100.000 varones y ajustada a la población mundial, de 13/100.000.

La estimación para la mortalidad en la Unión Europea en el año 1998 ajustada a la población estándar europea fue de 25,55/100.000

y ajustada a la población mundial, 14,65/100.000, siendo el país de mayor mortalidad Suecia y el de menor, Grecia.

Respecto a España, se ha estimado una mortalidad de 23.76 y 13,52 respectivamente. Según los datos del Centro Nacional de Epidemiología, la mortalidad ajustada a la población estándar europea por cáncer de próstata en España fue en el año 2003 de 19,63 casos/100.000 y la edad media de fallecimiento, de 75,06 años. ^(Berenguer A, BJU Int. 2003)

Factores de riesgo

Tienen un papel preponderante los factores genéticos y ambientales. En un estudio de Steinberg y colaboradores del año 1990, se objetivó que los individuos con un familiar de primer grado con cáncer de próstata tenían un riesgo duplicado de desarrollar la neoplasia, mientras que en los casos con dos o tres familiares de primer grado afectados, el riesgo aumentaba de 5 a 11 veces, respectivamente. ^(Steinberg GD. Prostate 1990)

Una pequeña subpoblación de pacientes con cáncer de próstata (aproximadamente el 9%) presenta un auténtico cáncer de próstata hereditario. Éste se define como tres o más familiares afectados o al menos dos familiares con enfermedad de comienzo precoz, es decir, antes de los 55 años ^(Carter BS Proc Natl Acad Sci USA 1992)

Se ha expuesto que diversos factores, tales como el consumo de alimentos, el modelo de conducta sexual, el consumo de alcohol, la exposición a radiación ultravioleta y la exposición laboral,

tienen importancia etiológica en el cáncer de próstata (^{Kolonel LN, Nat Rev Cancer 2004}). Entre los factores nutricionales que podrían influir en su aparición figuran el aporte calórico total (tal y como refleja el índice de masa corporal), la grasa de origen alimentario, la carne cocinada, micronutrientes y vitaminas (carotenoides, retinoides, vitaminas C, D y E), consumo de frutas y verduras, minerales (calcio, selenio) y fitoestrógenos (^{Schmid H-P Cancer Prevention. Recent Results Cancer Res 2007})

Los andrógenos influyen en el inicio y la progresión del cáncer de próstata, desde el mismo momento en que la próstata humana se desarrolla bajo la influencia de estas hormonas. El efecto de los andrógenos está mediado por el receptor de los andrógenos (RA) expresado en las células estromales, secretoras y en las intermedias; parece que la susceptibilidad a padecer cáncer de próstata, se transmite mediante polimorfismos del receptor de andrógenos (^{Kantoff P. Biochim biophys Acta 1998})

Etiología y genética

El crecimiento y desarrollo, tanto de la próstata normal, como del cáncer de próstata, son procesos regulados por los andrógenos. En la evolución del cáncer de próstata se puede pasar de una enfermedad hormono-dependiente y, por lo tanto, susceptible de terapias hormonales, a un proceso hormono-independiente u hormono-refractario. Los mecanismos por los cuales la enfermedad se transforma en hormono-

refractaria son desconocidos, pero se estima que desempeña un papel importante en su mecanismo el receptor de los andrógenos y sus “vías de señalización”. En este sentido, además de este receptor, en la etiología del cáncer de próstata están asociados distintos oncogenes, genes supresores tumorales y factores de crecimiento.

Existen también lesiones precursoras del carcinoma prostático, la *Hiperplasia adenomatosa atípica (HAA)* y la *Neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PINAG)*, ésta mucho más frecuente y con una fuerte asociación con el cancer de próstata, con el que en muchas ocasiones coexiste^(McNeal JE. Morphogenesis of prostatic carcinoma. Cancer. 1965;18: 1659-66.)

El receptor de los andrógenos pertenece a la familia de los receptores esteroideo/tiroideo/ácido retinoico, y su gen se encuentra en el cromosoma Xq1 1-12; como hemos comentado al principio del trabajo, éste receptor solamente lo expresan las células estromales durante el desarrollo embrionario, mientras que en la próstata adulta también se encuentra y, principalmente, en las células epiteliales; sin embargo, en la glándula tumoral, el receptor tiene una distribución muy heterogénea y se encuentra muy disminuido.

En la transformación a enfermedad hormono-refractaria pueden intervenir varios mecanismos: disminución en el número de receptores, amplificación del receptor o mutaciones en la región de unión al ligando, que hacen que el receptor responda a niveles inferiores de andrógenos, o

incluso a antiandrógenos. Además, el receptor también puede ser activado por otros factores de crecimiento peptídicos o citokinas, que pueden desencadenar otras vías de señalización.

El cáncer de próstata hereditario o familiar representa el 9% del total de neoplasias prostáticas^(Steinberg GD. Prostate. 1990). Existe, además, una cierta relación entre este cáncer y el cáncer de mama, de forma que en algunos estudios se ha comprobado que los genes implicados en el cáncer de mama hereditario BRCA-1 y BRCA- 2, también se asocian al cáncer de próstata^(Carter RF. Clin Invest Med. 2001) Sin embargo, sólo una pequeña proporción de tumores prostáticos derivan de cambios genéticos en las células germinales. Se han identificado numerosos *loci* asociados a una mayor susceptibilidad a padecer cáncer de próstata, y parece ser que en un tercio de los casos de cáncer de próstata familiar está implicada la región cromosómica HPCI (1q24-25), siendo otras regiones implicadas PCAP (1q42-43), CAPB (1q36) y HPCX (Xq27-28).

EL ANTIGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO (PSA)

Características bioquímicas

Con el fin de desarrollar un marcador tumoral para el cáncer de próstata más fiable y específico que la fosfatasa ácida, en los años 60 se descubrieron varios antígenos que posteriormente se denominaron *antígeno prostático específico (PSA)* ^(Ablin RJ., J. Immunol. 1970.). Fueron Wang y sus colaboradores quienes en 1970 purificaron un antígeno del tejido prostático, que fue considerado específico y que posteriormente se denominó PSA, encontrándose en tejido prostático normal, tumoral benigno, hipertrófico y tumoral maligno ^(Wang MC Invest. Urol. 1979).

El PSA es una glucoproteína de cadena única, de 237 aminoácidos ^(Lundwall A. Molecular cloning of human prostatic specific antigen cDNA. FEBS Lett 214:317, 1987) y un peso molecular de 28.430 daltons ^(Belanger A. Prostate. 1995). El gen que codifica el PSA se denomina hKLK3 y se regula mediante los andrógenos; se sintetiza en el epitelio ductal y los acinos prostáticos ^(Wang MC. Prostate. 1981) y se localiza en el interior de la célula en forma de gránulos y vesículas citoplasmáticas, en el retículo endoplásmico rugoso, en vacuolas y gránulos de secreción, y en cuerpos densos lisosómicos ^(Armbruster DA Clin. Chem. 1993).

El PSA actúa como una proteasa de la serina con actividad proteolítica y se considera miembro de la familia de la calicreína humana. (Riegman PHJ Genomics. 1992) Su función consiste en producir la licuefacción del coágulo seminal mediante la proteólisis de las proteínas formadoras de gel en fragmentos más pequeños y solubles, liberando así a los espermatozoides (Lilja H J. Clin. Invest 1987).

Formas del PSA

La mayor parte del PSA aislado del fluido seminal es enzimáticamente activo y un 15 a 30% constituye una forma irregular. Existe un inhibidor de proteasa que afecta al PSA en el fluido seminal, el *inhibidor de la proteasa C* (PCI), que forma complejos con alrededor del 5% del PSA.

La posibilidad de medir las fracciones libre, ligada y total del PSA en suero ha sido utilizada para diferenciar las formas benignas y malignas de enfermedad prostática, y se ha visto que las células malignas pueden sintetizar α 1-antitripsina (ACT) y, por tanto, liberar a la sangre complejos de PSA-ACT (Bjork T. Urology 1994).

La concentración de PSA es un parámetro continuo: cuanto mayor es el valor, más probabilidades hay de que exista un cáncer de próstata. Esto significa que no hay un valor umbral o límite superior aceptado de forma universal.

Aproximadamente, entre el 25 y el 30% de varones con hipertrofia prostática benigna, y el 80% de varones con cáncer de próstata, tienen niveles de PSA superiores a 4 ng/ml (nanogramos por mililitro); alrededor del 20% de los varones con cáncer de próstata muestran niveles de PSA inferiores a 4 ng/ml. Muchos varones pueden tener un cáncer de próstata, a pesar de presentar concentraciones bajas de PSA^(Thompson IM. N Engl J Med 2004)

Se desconoce la causa por la cual en el cáncer de próstata existe una mayor proporción de PSA formando complejos con la ACT que en los pacientes con hipertrofia prostática benigna^(Stenman UH Carcer Res 1991).

Lilja y colaboradores demostraron que el PSA formando complejos con la ACT constituía la forma predominante del PSA en el suero (85% del PSA sérico total), dejando el resto para el PSA libre^(Lilja H. Clin.Chem 1991), y que la proporción PSA libre/PSA total era significativamente más baja en los pacientes con cáncer de próstata que en los que presentaban hipertrofia prostática benigna^(Christensson A. J. Urol. 1993). En relación con esto, Luderer y colaboradores observaron que el porcentaje de PSA libre permitía diferenciar mejor a los pacientes con hipertrofia prostática benigna de los que presentaban cáncer de próstata, en comparación con el PSA total^(Luderer AA. Urology 1995), siendo clínicamente más útil en los varones con una concentración sérica de PSA total de 2.5 a 10 ng/ml.

HBP y PSA

La determinación del nivel sérico de PSA está indicada en aquellos pacientes en los que la detección de un carcinoma de próstata alterará el manejo de la hipertrofia prostática benigna, puesto que por lo general ambas patologías coexisten. Se estima que un 28% de los pacientes con hipertrofia prostática benigna demostrada histológicamente presenta unos niveles de PSA superiores a 4 ng/ml. En estos casos, las determinaciones de la velocidad del PSA, la proporción PSA libre/PSA total y la densidad del PSA pueden aumentar la especificidad de esta prueba en varones con hipertrofia prostática benigna.

El PSA como prueba de detección del cáncer de próstata

Entre el 8 y el 15% de los varones mayores de 50 años presentan un PSA superior o igual a 4.1ng/ml según estudios de Catalona^(Catalona WJ N. England J. Med. 1991) y Labrie^(Labrie F. J. Urol. 1992).

La combinación del tacto rectal y la medición del PSA sérico representan la forma más útil para la detección del carcinoma prostático, siendo mayor la probabilidad de encontrar un cáncer de próstata a mayor grado de elevación del PSA y en los varones con un tacto rectal sospechoso^(Catalona WJ. JAMA 1993); sin embargo, no todos los varones con ca. de próstata presentan concentraciones plasmáticas de PSA elevadas^(Cooner WH. J. Urol 1990. y Brawer MK J. Endourol 1989. y Catalona WJ. J. Urol 1994).

La detección selectiva mediante PSA ha duplicado la proporción de tumores que permanecen localizados en la próstata al momento del diagnóstico en comparación con lo que ocurría antes de la introducción del PSA. También puede proporcionar una información prospectiva sobre el riesgo individual para el cáncer de próstata, incluso cuando se encuentra en valores normales y, así, en un estudio realizado por Gann y colaboradores en el que se evaluaron muestras de suero de 366 hombres con cáncer de próstata en un período de 10 años, la determinación basal del PSA proporcionó un período de tiempo medio para el diagnóstico de cáncer de próstata de 5.5 años^(Gann PJ. JAMA 1992).

Así pues, el nivel sérico de PSA total constituye la mejor prueba para la detección precoz del cáncer de próstata hasta la fecha. Tiene especificidad para la próstata pero no para el cáncer, ya que existen distintos factores que pueden modificar sus concentraciones séricas, como las manipulaciones físicas o farmacológicas, sin embargo, se ha convertido en un marcador imprescindible en la práctica clínica diaria permitiendo la detección de cánceres localizados en estadios precoces^(Carlos G. Arcangeli. Clin. Urol. de Norteamérica, 1997.).

Otros parámetros relacionados con el PSA

Debido a la falta de especificidad del PSA por el cáncer, sobre todo en una “zona gris” con valores de PSA entre 4.1 y 10.0 ng/ml, en los que existe una incidencia elevada de solapamiento de los resultados de PSA

entre los pacientes con hipertrofia prostática benigna y los que presenta cáncer de próstata, se han desarrollado varios parámetros a fin de optimizar la utilización clínica del PSA, respetando su sensibilidad y mejorando su especificidad.

Densidad de PSA (dPSA)

Se define como el *cociente entre el valor de PSA total (medido en ng/ml) y el volumen de la próstata (medido en centímetros cúbicos)*. Las células prostáticas normales, productoras de PSA, requieren una cierta cantidad de apoyo del estroma (volumen de la glándula) para mantener una morfología y función normales. Este principio es respetado en el tejido prostático normal y en la hipertrofia prostática benigna, produciéndose incrementos del PSA en torno a 0.3 ng/ml por cada gramo de tejido. Sin embargo, no se cumple en los tejidos malignos, en los que el crecimiento es mucho más anárquico y los incrementos de PSA mucho mayores, en torno a 3.5 ng/ml por cada gramo de tejido prostático ^{(Seaman}

E. Urol. Clin. North Am. 1993 y Stamey TA. N. Engl J Med. 1987)

Parece que este valor refleja mejor las diferencias biológicas entre el cáncer de próstata y la hipertrofia prostática benigna, facilitando así la discriminación de la población con niveles de PSA comprendidos en la “zona gris”.

Velocidad del PSA

Introducido por Carter y colaboradores en 1992^(Carter B. JAMA, 1992), es un método más para valorar el riesgo de cáncer prostático que presenta un paciente. Tiene una elevada especificidad, pero requiere la realización de mediciones repetidas del PSA en un período de 1.5 a 2 años.

Se calcula mediante tres determinaciones séricas de PSA realizadas cada seis meses durante un tiempo no inferior a doce meses.

Una velocidad de PSA superior a 0,75 ng/ml se considera muy sugestiva de cáncer.

También permite determinar la necesidad de una biopsia prostática en hombres con una concentración sérica de PSA inferior a 4 ng/ml o para indicar la repetición de la biopsia ante un incremento de cualquier rango de PSA.

Rangos del PSA específicos por edad

El rango de referencia estándar de PSA oscila entre 0 y 4 ng/ml, pero no tiene en cuenta la variabilidad relacionada con la edad y los cambios en el volumen prostático secundarios al desarrollo de la hipertrofia prostática benigna. Para evitar este problema, Oesterling y colaboradores propusieron la utilización de rangos específicos de edad, incrementando la sensibilidad en los varones jóvenes y la especificidad en los mayores, de forma que establecieron unos niveles máximos de

normalidad de 2.5 ng/ml entre 40 y 49 años, 3.5 ng/ml entre 50 y 59 años, 4.5 ng/ml entre 60 y 69 y 6.5 ng/ml entre 70 y 79 ^(Oesterling Je. JAMA. 1993).

Porcentaje de PSA libre

En un estudio realizado por Christensson, se informó que cuando el PSA total se encontraba entre 4 y 20 ng/ml, un 95% de los pacientes con hipertrofia prostática benigna tenía un porcentaje de PSA libre superior al 18%, mientras que en el 71% de pacientes con cáncer de próstata estaba por debajo de este nivel ^(Christensson A. J.Urol. 1993); desde entonces, se ha utilizado este parámetro para reducir la tasa de biopsias innecesarias cuando el PSA total oscila entre 2 y 10 ng/ml o entre 3 y 10 ng/ml.

FACTORES PRONÓSTICOS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata presenta una historia evolutiva heterogénea y difícil de predecir, de forma que para seleccionar la terapia más adecuada se precisa de algún mecanismo que nos permita clasificar al paciente en función de sus características clínicas específicas y, al mismo tiempo, nos permitan identificar a pacientes de alto riesgo para desarrollar metástasis. Estos mecanismos son lo que denominamos *factores pronósticos*, que se pueden evaluar mediante la exploración física, analítica sanguínea, estudios de imagen, y el estudio microscópico del material histológico.

Un grupo multidisciplinar de patólogos, clínicos y estadísticos analizaron dichos factores agrupándolos en tres categorías según la base científica sobre la que se apoyan.

En el año 1999, el *College of American Pathologist* ^(Bostwick D.G. Arch. Pathol. Lab. Med 2000), mediante consenso clasificó los factores pronósticos en varias categorías:

a) **Categoría I**, de importancia pronóstica probada y utilidad clínica en el manejo del paciente (estadío tumoral-TNM-, grado de Gleason, estado del margen quirúrgico, y PSA perioperatorio).

b) **Categoría II**, estudiados biológica y clínicamente, pero su importancia todavía no ha sido validada con estudios estadísticos de impacto (ploidía, tipo histológico, volúmen tumoral).

c) **Categoría III**, de significado incierto, puesto que todavía no han sido lo suficientemente estudiados como para demostrar su importancia pronóstica (antígeno prostático específico de membrana, invasión perineural, invasión vascular linfática, receptores de andrógenos, marcadores neuroendocrinos y genéticos, otros marcadores séricos).

Categoría I de factores pronósticos

Estadio tumoral

Se obtiene a través de la combinación del tacto rectal, técnicas de imagen (tomografía axial computerizada, gammagrafía ósea) y del examen de la pieza de prostatectomía. Es capaz de predecir la evolución de la enfermedad de forma más precisa que los factores preoperatorios; se considera el factor más importante.

La clasificación TNM (tumor, nódulos, metástasis) de la *American Joint Committee for Cancer Staging and End-Results Reporting* (Montie,1993) y sus actualizaciones posteriores ^(Sobin LH.Cancer 1997), se ha convertido en el más utilizado en la actualidad.

En estudios basados sobre especímenes de prostatectomías radicales se ha demostrado que un factor pronóstico favorable es la presencia del tumor confinado a la próstata (estadio patológico T₁ y T₂) y, que por el contrario, la extensión más allá de los límites de la glándula (estadio patológico T₃) confiere un pronóstico muy desfavorable.

La afectación de ganglios linfáticos en el momento de la prostatectomía radical, en la actualidad es poco frecuente, por lo que se cuestiona la realización de la linfadenectomía ílio-obturatriz bilateral de forma rutinaria^(Nelson JB Urol. Clin. North. Am. 2003). Sin embargo, la afectación linfática implica que en aproximadamente un 80% de los pacientes aparecerán metástasis a distancia en los cinco primeros años tras el diagnóstico^(Oesterling JE., Cancer: Principles and Practice of Oncology, 5ª ed. Filadelfia: Lippincot-Raven, 1997).

El riesgo de metástasis se correlaciona con los factores anteriormente mencionados y según la localización metastásica, también se han caracterizado grupos pronósticos^(Eisemberger MA Semin. Oncol. 1994): las limitadas al esqueleto óseo, con una supervivencia de tres años o más, y los que presentan afectación visceral o enfermedad sintomática, con una supervivencia inferior a un año.

Grado histológico

La clasificación más utilizada para la gradación histológica del cáncer de próstata es la escala de Gleason, que valora separadamente los dos patrones de crecimiento más frecuentes (primario y secundario) y puntúa cada uno de ellos de 1 a 5, de mejor a peor diferenciado, siendo informado como la suma de ambos (Gleason DF. Urologic pathology: The prostate. Philadelphia, PA.: Lee and Febiger 1977). Según ésta clasificación:

Tabla 2: Patrones de Gleason

Patrón 1	Muy bien diferenciados, glándulas pequeñas, apretadas, uniformes
Patrón 2	Variación en tamaño y forma de las glándulas, y mayor atipia en las células individuales. El patrón cribiforme puede estar presente, siendo circunscrito, más laxo
Patrón 3	Marcada irregularidad en el tamaño y la forma de las glándulas, pequeñas glándulas o células individuales invadiendo el estroma
Patrón 4	Células claras grandes que crecen en un patrón difuso (pueden mostrar formación de glándula)
Patrón 5	Tumores muy poco diferenciados; masas sólidas o de crecimiento difuso con poca o ninguna diferenciación en las glándulas

La mayoría de los carcinomas con baja graduación de Gleason están confinados dentro de la cápsula prostática, mientras que aquellos de alta graduación frecuentemente la invaden (66% cuando es superior a 6 y 32% cuando es inferior o igual a 6).

La importancia de esta graduación reside en su correlación con otros parámetros tumorales evolutivos como la supervivencia, el volumen tumoral y la presencia de invasión ganglionar, de forma que tras 10 años

de seguimiento se han descrito la aparición de metástasis en el 14-19%, 42% y 74% de pacientes con carcinoma prostático localizado y grados de Gleason 2-4, 5-7 y mayor de 7, respectivamente; además, se ha descrito que en esos mismos pacientes el riesgo de fallecimiento a causa de la enfermedad a los 10 años del diagnóstico es del 13%, 20% y 66%, respectivamente. Por otro lado, se ha comprobado que tumores con Gleason 7 son más agresivos y con mayor capacidad para la invasión linfática que los tumores con Gleason 5-6 y que para una puntuación de Gleason 7, los que son 4+3 el riesgo de progresión a 5 años es del 40%, mientras que para los 3+4, es del 15%^(Chan TY Urology 2000). En cuanto a la supervivencia a 10 y 15 años, los tumores con grado de Gleason 3 ó inferior, ha sido estimada en torno a 95 y 93%, respectivamente, para los Gleason 4-6 de 90 y 82% y para los Gleason 7 ó superior, del 80 y 70%, respectivamente^(Zincke et al., 1994?).

Afectación de los márgenes quirúrgicos

Se define como *márgen positivo* la presencia de tumor en la superficie tintada de la pieza quirúrgica que representa la zona de corte. La importancia pronóstica de este factor depende de la consideración de la extensión tumoral extracapsular, ya que se ha visto en algunos estudios que, aún con márgenes positivos, no existe progresión tumoral a los 5 años en el 83% de los casos sin extensión extracapsular, mientras que en los que presentan extensión extracapsular, sólo en 63% de casos no se detecta progresión^(Ohori M J. Urol 1995).

La incidencia de márgenes positivos ha disminuido en los últimos años debido a una mejor selección de los pacientes, una mejora de la técnica quirúrgica y a un diagnóstico cada vez más precoz.

Niveles séricos de PSA

Desde su hallazgo en el suero de pacientes con cáncer de próstata, en 1980, el uso del PSA se ha utilizado rutinariamente para identificar a los varones con riesgo de padecer cáncer de próstata y para un diagnóstico precoz del carcinoma prostático localizado. Del mismo modo, es un valioso marcador clínico para la monitorización del tratamiento.

El valor del PSA pretratamiento se correlaciona con el volumen del tumor, el estadio clínico y patológico del tumor, el grado histológico del mismo y con la presencia o ausencia de metástasis ^{(Babaian RJ}

J. Urol. 1995 y Bluestein DL J. Urol. 1994 y Parra RO. J. Urol. 1996)

En cuanto a su significación pronóstica, se ha visto que en los pacientes sometidos a prostatectomía radical con valores de PSA de 4 ng/ml o inferiores, la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años está entre el 90% y el 97%, descendiendo al 80% cuando el PSA se sitúa entre 4 y 9,9ng/ml, al 60-70% entre 10 y 20ng/ml y por debajo del 50% para valores superiores a 20ng/ml ^{(Partin AW.}

Urol. Clin. North. Am. 1993 y Catalona WJ. J. Urol. 1994)

En cuanto al PSA post-tratamiento, es sensible en la detección del cáncer residual, de la recidiva y de la progresión tumoral.

Tras la prostatectomía radical, el PSA cae a niveles indetectables, debiendo considerarse significativo cualquier nivel detectable, interpretándose como *fracaso bioquímico* valores superiores a 0,20 ng/ml (Polascik TJ. J Urol 1999 y Moul JW. J Urol 2000). Después de la radioterapia, una definición razonable de recidiva bioquímica consiste en tres aumentos consecutivos, según las recomendaciones del grupo de consenso de la *American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO)* (American Society for Therapeutic Radiology and Oncology Consensus Panel. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997). La nueva definición indica una recidiva cuando el aumento del PSA es ≥ 2 ng/ml mayor que el valor nadir de PSA, independientemente de la concentración sérica del nadir (Roach M 3rd. Int J Radiat Biol Phys 65).

Categoría II de factores pronósticos

Volumen tumoral

Este parámetro se estima en base a métodos de imagen y en base a la biopsia prostática transrectal ecodirigida. Se relaciona con el grado de Gleason, invasión capsular y de los bordes afectación de las vesículas seminales y con las metástasis ganglionares.

Se ha descrito que los casos de cáncer prostático localizado con un volumen tumoral menor o igual a 1cm^3 tienen un pronóstico excelente, mientras que si es mayor o igual a $1,5\text{cm}^3$, la posibilidad de

curación desciende significativamente (Babaian RJ. J. Urol. 1995). A día de hoy, un umbral de volumen del cáncer de próstata de $0,5 \text{ cm}^3$ sigue siendo un parámetro importante para distinguir entre cánceres insignificantes y clínicamente importantes (Stamey TA. J Urol 2000). Así mismo, en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años, los pacientes con tumor en estadios localizados (T_1) es del 95% y del 63% para los casos de afectación extraprostática (T_3) (Partin AW. Urol. Clin. North. Am. 1993; 20: 713-725). La afectación ganglionar se ha estimado más frecuente en volúmenes tumorales superiores a 4 cm^3 (Partin AW Urol. Clin. North. Am. 1993 y McNeal JE. Am. J.Surg. Pathol. 1990).

La combinación del volumen tumoral y de la afectación de las vesículas seminales puede predecir la incidencia de metástasis ganglionares, de forma que si el volumen tumoral es inferior a 4 cm^3 , en más del 90% no habrá invasión de las vesículas, mientras que sólo el 15% de los pacientes con un volumen tumoral mayor de 12 cm^3 no la tendrán (Villers A. J. Urol. 1989).

Tipo histológico

La mayoría de los adenocarcinomas de próstata tienen una morfología acinar, sin embargo, existen otros subtipos, menos frecuentes pero que tienen una importante significación pronóstica. Así, el *carcinoma ductal de próstata*, que representa el 1% de los tumores prostáticos, se considera muy agresivo y en la conferencia de consenso del año 2005 se le asignó un grado de Gleason 8 (4+4), al igual que el subtipo *mucosecretor*.

El *carcinoma de células en anillo de sello* es poco frecuente y de significado pronóstico incierto. El *carcinoma de célula pequeña de próstata* representa un 2% de los tumores prostáticos y, al igual que su homólogo de pulmón, responde a tratamiento mediante radioterapia y quimioterapia.

Tiene especial importancia el subtipo histológico *transicional*, puesto que debe diferenciarse de los tumores de origen vesical y debe descartarse que se trate de una infiltración prostática secundaria a un tumor vesical.

Los *carcinomas de células escamosas* y los *sarcomas* son extremadamente raros.

El carcinoma de próstata con *diferenciación neuroendocrina* tiene especial interés dado que parece asociarse a resistencia a la hormonoterapia ^(Huss WJ. Prostate 2004).

Contenido de ADN e índices de proliferación acinar

El contenido de ADN (ploidía) se cuantifica mediante técnicas de citometría de flujo y representa, junto a la proliferación acinar, uno de los parámetros de la biología molecular más evaluados en los tumores. Las células normales tienen un contenido diploide de ADN, pero se ha comprobado que muchos carcinomas prostáticos son aneuploides o con una cantidad anormal de ADN, asociándose este hecho a un peor pronóstico ^(Veltri RW. J. Cell Biochem. 1994). También se ha descrito la ploidía como

un factor pronóstico independiente, sobre todo para predecir el pronóstico de los tumores con grado de Gleason intermedio (5-7) ^(Lieber MM. Urology 1995).

Otros métodos para valorar la actividad proliferativa en el cáncer de próstata incluyen la determinación de antígenos asociados al ciclo celular, mediante el uso de anticuerpos monoclonales como el *Ki 67*, el *antígeno nuclear de proliferación celular* (PCNA) o la *ciclina*.

En cuanto al *Ki 67*, se sabe que su expresión es mayor en la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado que en la hipertrofia prostática benigna, pero menor que en el cáncer de próstata. Igualmente, se ha visto que una mayor expresión de *Ki 67* se correlaciona con el fracaso bioquímico en pacientes sometidos a radioterapia ^(Moul JW Surgery 1996).

Categoría III de factores pronósticos

A pesar del gran conocimiento experimentado en la última década sobre la biología y el comportamiento del cáncer de próstata, todavía son necesarios nuevos parámetros que nos permitan conocer y predecir con mayor exactitud la complicada historia natural del cáncer de próstata. Estos nuevos marcadores incluyen los *oncogenes* y *genes supresores*, *factores de crecimiento* y *receptores hormonales*, *moléculas de*

adhesión, y enzimas proteolíticos y sus inhibidores. También se incluyen dentro de esta categoría la *invasión perineural, la invasión vascular y/o linfática* y la *densidad microvascular.*

Oncogenes y genes supresores

La activación de los oncogenes junto a la inactivación de los genes supresores de los tumores, además de la necesaria participación de factores ambientales, son los responsables del inicio del proceso transformador neoplásico, de forma que las proteínas producidas por los oncogenes pueden actuar como factores de crecimiento, receptores de membrana o factores de transcripción, mientras que las proteínas producidas por los genes supresores de los tumores actúan como mecanismo de regulación negativa de la proliferación celular, inhibiendo el crecimiento tumoral. Actualmente se han identificado genes que son clave y son utilizados como marcadores tumorales.

En relación con el cáncer de próstata se han descrito anomalías cromosómicas en 6q, 8p, 10q, 13q, 16q y 18q, con pérdidas de regiones cromosómicas que contienen genes supresores^(Elo JP. Ann. Med. 2001).

- **GSTP 1**

También denominado *Glutation-S-Transferasa*, es el gen más frecuentemente alterado en el cáncer de próstata ^(DeMarzo AM. Lancet 2003). Su ausencia se ha observado en el 90% de los cánceres de próstata y en el 70% de las lesiones prostáticas intraepiteliales.

- **BCL-2**

Este gen codifica una proteína que inhibe la muerte celular o apoptosis y no está expresada en las células prostáticas normales. Su sobre-expresión prolonga la supervivencia de las células tumorales. Se ha relacionado con tumores avanzados, enfermedad metastásica y grado de Gleason elevado ^(Lipponem P Prostate 1997). La regulación de la integridad de los microtúbulos podría ser un mecanismo mediante el cual *bcl-2* induce su efecto antiapoptótico ^(Haldar S. Cancer Res 1997 y Stapleton AM. Clin Cancer Res 1997)

- **C-MYC**

Perteneciente a la familia de oncogenes *myc* (reguladores de la diferenciación y proliferación celular), y localizado en el cromosoma 8. Su expresión es fundamental para que la célula entre en el ciclo celular. Se relaciona con un comportamiento más agresivo de la enfermedad.

- **RAS**

Pertenece a una familia de proto-oncogenes productores de la proteína p21. Su mutación origina un aumento en la cantidad de su forma activada, que estimula el crecimiento celular. La primera vez que se demostró la presencia del gen *ras* en el cáncer de próstata fue en 1987 (Peehl DM. Prostate 1987).

- **TP 53**

Localizado en el brazo corto del cromosoma 17, su proteína (p53) inhibe el crecimiento de las células tumorales. Se ha relacionado con un grado de Gleason elevado, el estadio patológico y el índice de proliferación celular (Augustin H J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2003). El gen supresor tumoral *p53* está mutado con mayor frecuencia en el cáncer de próstata independiente de los andrógenos. Se ha demostrado que la sobreexpresión de *bcl-2* y *p53* en piezas de prostatectomía predice una evolución clínica agresiva (Bauer JJ, J Urol 1996 y MacGrogan D. Semin Cancer Biol 1997). Por otra parte, parece mostrarse como un marcador pronóstico independiente del intervalo libre de enfermedad en el cáncer de próstata y también se ha visto que las alteraciones de p53 se han relacionado con una disminución de la supervivencia.

- **Gen del retinoblastoma**

Su producto es una de las proteínas reguladoras de la transición de la fase *G1* a *S* del ciclo celular. Se encuentra en el cromosoma 13 y su alteración se asocia a cáncer de próstata avanzado. Su ausencia se asocia a mal pronóstico.

Receptores androgénicos

El cáncer de próstata es una enfermedad hormonodependiente, y por ello, en los casos de enfermedad avanzada, los esfuerzos terapéuticos van dirigidos a bloquear esa dependencia, recurriendo a las terapias antiandrogénicas que desencadenan una apoptosis masiva de esas células tumorales andrógeno-dependientes.

El receptor androgénico pertenece a la familia de las proteínas de transcripción y su gen codifica un receptor citosólico que capta andrógenos. El complejo receptor-andrógeno atraviesa la membrana nuclear para actuar como un factor de transcripción genético e inducir la proliferación celular. La proteína del receptor de andrógeno se expresa tanto en tumores primarios, como en tumores locales recurrentes y también en metástasis.

Existen distintas alteraciones en el receptor androgénico que inducen el desarrollo y progresión del cáncer de próstata ^(Elo JP. Ann. Med. 2001);

- Alteración de la especificidad del receptor androgénico.
- Amplificación del gen del receptor androgénico.
- Sobre-expresión del receptor androgénico.
- Menor longitud del dominio amino terminal del receptor androgénico.

Factores de crecimiento y sus receptores

Estos factores son proteínas de regulación del crecimiento, diferenciación y apoptosis celular. Son varias:

- **Factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento transformante α (TGF- α)**, relacionados con la diferenciación celular y la angiogénesis ^(Ibrahim GK. J. Urol. 1993 y Wilding G. Prostate 1989).
- **Factor de crecimiento insulínico I (IGF-I)** ^(Cardillo MR Anticancer Res. 2003).
- **Factor transformante de crecimiento β (TGF- β)**. Inhibe las células epiteliales normales e induce la muerte celular y la angiogénesis ^(Steiner MS Mol. Endocrinol. 1992); también promueve la producción de matriz extracelular e induce inmunodepresión.

Moléculas de adhesión

Son un grupo de estructuras celulares de superficie involucradas en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, cuya alteración juega un papel importante en la invasión tumoral y el desarrollo de metástasis. (Liotta LA Ann. Rev. Biochem. 1986)

La ***E-caderina*** es muy importante en la adhesión epitelial y sus alteraciones producen un aumento de la capacidad de invasión tumoral. Se ha encontrado una gran relación entre los tumores prostáticos de alto grado de Gleason y la disminución de la tinción inmunohistoquímica para la ***E-caderina***. (Kallakury BV. Cancer 2001)

Las ***Integrinas*** son una familia de receptores de la superficie celular que reconocen y se unen a los componentes de la matriz extracelular. Intervienen en el comportamiento metastásico de algunos tumores. En el cáncer de próstata se pierde la expresión de las integrinas $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv y $\beta 4$; también se ha comprobado unos niveles elevados de integrina $\alpha 6$ en tumores más agresivos (Cress AE Cancer Metastasis Rev. 1995)

Enzimas proteolíticos y sus inhibidores

Intervienen en procesos fisiológicos como la coagulación sanguínea, la fibrinólisis, la organogénesis y remodelación tisular o la migración celular. Parecen estar implicados en el proceso de transformación maligna debido a su actuación sobre la degradación de la matriz extracelular, facilitando la invasión tumoral y el desarrollo de metástasis ^(Liotta LA Cell 1991).

Las enzimas proteolíticas pueden producirse tanto por las células tumorales como por las células estromales adyacentes y pueden inducir alguna o varias de estas acciones: estímulo de la proliferación y diferenciación celular, activación de hormonas y factores de crecimiento, reducción de la adhesividad entre células malignas, alteración de la membrana celular, migración celular...

En la familia de las enzimas proteolíticas se encuentran las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), las serín-proteasas (tripsina, quimotripsina, trombina, plasmina, catepsina G, activadores del plasminógeno), las aspartil-proteasas (catepsina D, proteasa ácida lisosomal, pepsinógeno C).

Nos referiremos a las metaloproteasas en un apartado posterior.

Por lo que se refiere a las serin-proteasas, hay que decir que se han encontrado niveles elevados del activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA) en el cáncer de próstata hormono-independiente ^(Helenius MA Cancer Res. 2001).

En cuanto a las aspartil-proteasas, se sabe que por ejemplo, la catepsina D se expresa en tumores de próstata con grado de Gleason entre 5 y 8, teniendo, por tanto, un importante valor como indicador de invasión estromal por el tumor ^(Sinha AA. Prostate 1995).

El pepsinógeno C presenta una elevada expresión en los tumores mamarios bien diferenciados, considerándose como un indicador de pronóstico favorable ^(Vizoso F. J. Clin. Oncol 1995). En el cáncer de próstata también se ha descrito la expresión de pepsinógeno C en un porcentaje significativo de tumores ^(Merino AM. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo. 1998), encontrándose una asociación significativa con una mayor supervivencia en pacientes con cáncer de próstata en estadio tumoral D y sometidos a tratamiento hormonal antiandrogénico.

LAS METALOPROTEINASAS DE MATRIZ

Las Metaloproteinasas son enzimas proteolíticas, secretadas como zimógenos inactivos, y que requieren de su activación para poder actuar y un pH neutro. Pueden degradar algunos elementos de la membrana basal y del estroma tumoral, como los colágenos, la fibronectina y los proteoglicanos^(Liotta LA Semin Cancer Biol 1990), de ahí su creciente interés.

La familia de MMPs humana está constituida por 28 miembros homólogos de endopeptidasas dependientes de Zinc, las cuales pueden dividirse en ocho clases estructurales, o basadas en su especificidad de sustrato y estructura primaria en subgrupos de familias como las collagenasas (MMP-1, -8, -13), gelatinasas (MMP-2 y -9), estromalinas (MMP-3, -10, -11), MMPs asociadas a membrana (MMP-14, -15, -16, -17, -23, -24, -25) y otras nuevas MMPs (-33 y -36).

Tabla 3. Clasificación de las metaloproteasas.

GRUPO	MMP	NOMBRE	SUSTRATO
Colagenasas	MMP-1	Colagenasa fibroblástica	Colágenos fibrilares tipos III, I, II, VII y X, agreganos y serpinas
	MMP-8	Colagenasa de neutrófilos	Colágenos fibrilares I, III y II, agreganos
	MMP-13	Colagenasa 3	Colágeno tipo II
Gelatinasas	MMP-2	Gelatinasa A 72 kDa gelatinasa	Colágenos IV, V, VII y X, elastina
	MMP-9	Colagenasa 4 Colagenasa 5 92kDa gelatinasa	Colágenos I, IV, V, elastina
Estromelisinias	MMP-3	Estromelisinina-1	Fibronectina, colágenos IV, V, IX, y X, elastina, laminina y proteoglicano
	MMP-10	Estromelisinina-2	Fibronectina, colágenos III, IV, V, elastina, laminina y proteoglicanos
	MMP-11	Estromelisinina-3	Muy débilmente: laminina y fibronectina
Matrilisinias	MMP-7	Matrilisinina PUMT-1 Matrina	Proteoglicanos, laminina, fibronectina, elastina, gelatina
Metaloelastasas	MMP-12	Metaloelastasa macrofágica	Elastina, fibronectina, colágeno tipo IV
Metaloproteinasas de membrana	MMP-14	MT1-MMP	Colágenos I, II y III, laminina, gelatina, fibronectina y proteoglicanos
	MMP-15	MT2-MMP	ProMMP-2
	MMP-16	MT3-MMP	ProMMP-2
	MMP-17	MT4-MMP	ProMMP-2
	MMP-24	MT5-MMP ProMMP-2	ProMMP-2
	MMP-25	MT6-MMP	Forma parte de la actividad proteolítica leucocitaria
Miscelánea	MMP-19	RASI-1	Gelatinas
	MMP-20	Enamelsina	Amelogelina
	MMP-21	XMMP	
	MMP-22	CMMP	
	MMP-23	CAMMP	
	MMP-26	Endometasa	
	MMP-27	-	Gelatina tipo I, vitronectina y colágeno desnaturalizado
	MMP-28	Epilisinina	

Como decíamos anteriormente, las MMPs son sintetizadas como zimógenos inactivos, los cuales son activados principalmente en la periferia celular por otras MMPs o por serín-proteasas. La actividad de las MMPs es específicamente inhibida por los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs) o por proteasas inhibitoras no específicas (por

ejemplo, la $\alpha 2$ -macroglobulina). Se conoce que existen cuatro TIMPs distintos: TIMP-1, -2, -3 y -4. El balance entre las MMPs y sus inhibidores es esencial en muchos procesos fisiológicos en los que se requiere una rápida remodelación de la matriz extracelular, lo cual se ve alterado en algunas condiciones patológicas como el cáncer.

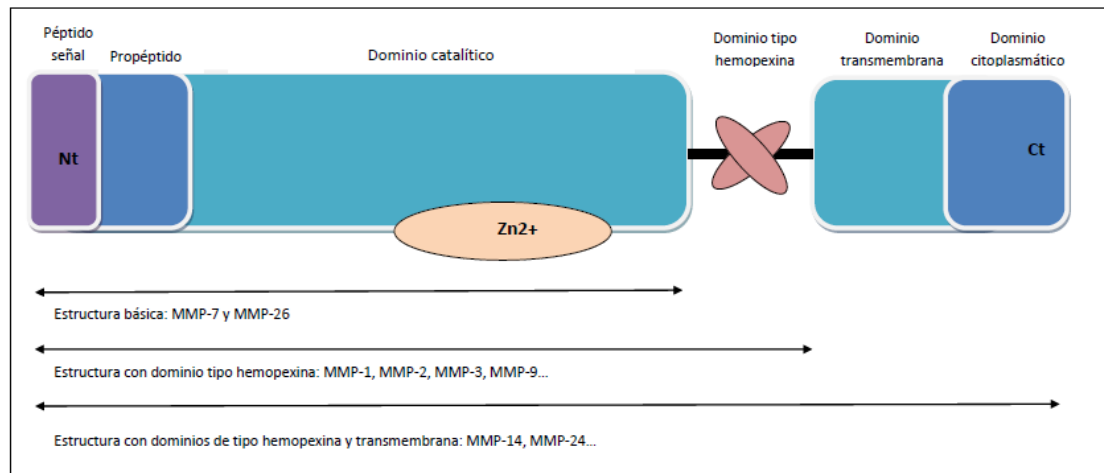


Figura 2. Estructura básica de las metaloproteinasas.

A medida que las células tumorales crecen y se dividen, secretan metaloproteinasas que rompen el estroma y la membrana basal, y al mismo tiempo, se reduce la producción de inhibidores tisulares de MMP (TIMP) que amplifica el proceso.

Existen estudios ^(Wood M. Clin Exp Metast 1997) que han demostrado la correlación entre el aumento de los niveles intratumorales de MMP-2 (gelatinasa A) y MMP-9 (gelatinasa B), y la ausencia de los inhibidores TIMP-1 y TIMP-2, y el grado de Gleason indiferenciado.

Otros estudios han demostrado que se requiere la MMP-2 para que un tumor se transforme en un fenotipo angiogénico (Fang J. Proc Natl. Acad Sci USA. 2000). Otro grupo informó el requerimiento de MMP-9 para las metástasis de cáncer de próstata en un modelo murino (Sehgal G. Am J. Pathol 1998).

También se ha comunicado la expresión de múltiples metaloproteinasas en muestras clínicas de cáncer de próstata humano (Upadhyay J. Clin. Cancer Res. 1999). Se ha demostrado que diferentes tipos de células malignas, como las de origen mamario o prostático, reclutan activamente fibroblastos en el interior de los tumores, ocasionando un incremento en la extensión de la degradación de la matriz extracelular (Sloane BF Semin Cancer Biol 2005).

Además, existe creciente evidencia que indica la contribución de la variabilidad de las características biológicas del estroma tumoral a la heterogeneidad clínica y biológica del cáncer de mama (West RB, PLoS Biol 2005 y - Bacac M, PLoS ONE 2006 y -Patocs A N Engl J Med 2007 y Fukino K, *Jama* 2007 y Bergamaschi A, J Pathol 2008 y Beck .Lab Invest. 2008). De acuerdo con esto, recientemente se ha demostrado que la expresión de diversas metaloproteasas (MMPs) y sus inhibidores (TIMPs) por los fibroblastos y/o células mononucleares inflamatorias del estroma tumoral del cáncer de mama están significativa e independientemente asociados con el desarrollo de metástasis a distancia, resultando los factores pronósticos más potentes (Vizoso FJ British Journal of Cancer 2007 y - González LO, British Journal of Cancer 2007). Cabe también señalar la identificación por el Grupo de Vizoso (González LO, Histopathology 2008) de cambios significativos de la expresión de esos factores por las células estromales

que rodean los conductos mamarios neoplásicos en el carcinoma “in situ” de mama, lo que parece indicar la existencia de cambios en la biología de las células estromales adyacentes a las células cancerosas, ya en las fases más precoces de la transformación maligna.

En relación con el cáncer prostático, datos publicados por el Grupo de Vizoso^(Escaff S, World J Urol. 2011), también indican que la expresión de MMPs por fibroblastos del estroma tumoral se asocia con una mayor probabilidad de recurrencia bioquímica en pacientes que se sometieron a prostatectomía radical por tumores órganoconfinados. Además, se ha observado sobre-expresión de MMPs y TIMPs, no sólo en el estroma de los carcinomas prostáticos, sino también en un porcentaje significativo de casos de neoplasias intraepiteliales prostáticas de alto grado e, incluso, en hiperplasias prostáticas benignas. Todo ello nos induce a considerar el interés potencial del análisis fenotípico de las células del estroma tumoral en cuanto a la estimación de riesgo de desarrollar cáncer prostático y/o como elementos adicionales de cara a establecer el diagnóstico del carcinoma.

Aunque las MMPs son expresadas por distintos tejidos en varios estadios de su desarrollo, están ausentes en las células normales de organismos adultos^(Stamenkovic I. Semin Cancer Biol 2000). Sin embargo la expresión de MMPs en el tejido neoplásico es elevada debido a su regulación de forma paracrina por los factores de crecimiento y citoquinas secretadas por las células tumorales o del estroma^(Meller D Invest Ophthalmol Vis Sci 2000).

Las MMPs son capaces de escindir factores de crecimiento, receptores de superficie celular, moléculas de adhesión o quimoquinas (Turk V, Cancer Cell 2004 y -Rifkin DB, Apmis 1999 y -Manes S, J Biol Chem 1999 y -Noe V, J Cell Sci 2001).

Además, mediante la escisión de factores pro-apoptóticos, las MMPs pueden producir un fenotipo más agresivo mediante la generación de células resistentes a la apoptosis (Fingleton B. Neoplasia 2001).

Las MMPs también pueden regular la angiogénesis en el cáncer, tanto positiva a través de su capacidad para movilizar o activar factores pro-angiogénicos (Stetler-Stevenson WG J Clin Invest 1999), como negativamente mediante la generación de inhibidores de la angiogénesis, tales como la angiostatina y endostatina (Dong Z. Cell 1997 y -Cornelius LA. J Immunol 1998 y -Ferrerias M FEBS Lett 2000).

Trabajos publicados recientemente tratan de conocer la validez de las MMPs como marcador complementario al PSA en el diagnóstico y el pronóstico del carcinoma de próstata (Iván González Rodríguez, Arch. Esp. Urol. 2010). En el mismo camino, se han realizado trabajos para conocer la relación entre los distintos polimorfismos de los genes de las MMPs y el riesgo de padecer varios tipos de cáncer, y en concreto con el cáncer de próstata, así como su agresividad tumoral (RodrigoGil, Arch esp Urol.2010).

También en estos momentos se asume que los TIMPs son proteínas multifactoriales involucradas en la inducción de la proliferación

y en la inhibición de la apoptosis^(-Jiang Y,. Oncogene 2002 y -Wurtz SO. Endocr Relat Cancer 2005).

En el cáncer de próstata se ha reportado la expresión de varias MMPs y TIMPS, tales como MMP-2, -7, -9, -13, TIMP-1, -2, y -3^(-Brehmer B, Prostate Cancer Prostatic Dis 2003 y -Pang ST,. Oncol Rep 2004 y -Ma X, Proc Natl Acad Sci U S A 2003 y -Morgia G,. Urol Res 2005. y -Semaan M, Prog Urol 2005. y -Riddick AC,. Br J Cancer 2005 y -Cardillo MR,. Anticancer Res 2006).

Además estudios experimentales indican un papel de algunas de estas MMPs en la agresividad de las células en el cáncer de próstata^(-Dennis LK, Urology 2002 y -Bratland A, Clin Exp Metastasis 2003 y- Daja MM. Prostate Cancer Prostatic Dis 2003 y -Dong Z, Am J Pathol 2005 y - Li HC Breast Cancer Res Treat 2004 y - Nabha SM,. Clin Exp Metastasis 2006).

Estudios clínicos han demostrado una asociación entre la expresión de MMPs y/o TIMPs y parámetros indicativos de agresividad tumoral o peor pronóstico en pacientes con cáncer de próstata^(Brehmer B,. Prostate Cancer Prostatic Dis 2003 y - Morgia G. Urol Res 2005 y - Semaan M, Prog Urol 2005. y- Riddick AC,. Br J Cancer 2005 y- Cardillo MR,. Anticancer Res 2006).

Sin embargo, son pocos los datos que existen sobre la importancia de la expresión diferencial de estos factores por las células estromales de los procesos prostáticos benignos de cara a contribuir al diagnóstico de cáncer prostático o estimar el riesgo de su desarrollo.

EXPERIENCIA PREVIA DE NUESTRO GRUPO

Las MMPS son las principales mediadoras en las alteraciones observadas en el microambiente tumoral durante la progresión del cáncer (Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. FEBS J 2011;278: 16-27). En el crecimiento tumoral tienen un papel fundamental en la degradación del tejido conectivo y la membrana basal, la angiogénesis, la modulación de citoquinas y activación de factores de crecimiento y receptores de superficie para distintas moléculas de adhesión (Van Damme J, Struyf S, Opdenakker G. Chemokineprotease interactions in cáncer. Semin Cancer Biol 2004; 14: 201-8).

Basándonos en los procesos relacionados con la agresividad tumoral, el grupo de la Unidad de Investigación del Hospital de Jove ha realizado un estudio de la expresión de diferentes factores (MMP 1, 2, 7, 9, 11, 13 y 14) y sus inhibidores (TIMP 1, 2 y 3) en células epiteliales del cáncer de mama, en fibroblastos peritumorales y en células inflamatorias mononucleares presentes en el tumor (Vizoso FJ, Gonzalez LO, Corte MD, Rodríguez JC, Vázquez j, Lamelas MI, Junquera S, Merino AM, García-Muñinz JL. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cáncer. Br J Cancer 2007;96(6):903-11). Es el primer estudio en el que se analiza la expresión de MMPS y TIMPS en cáncer de mama humano utilizando la técnica de microarrays permitiendo integrar diferentes aspectos de biológicos del tumor en el contexto morfológico del carcinoma de mama.

Vizoso y colaboradores demostraron que una elevada expresión de MMP-9 correlaciona significativamente con la agresividad tumoral y mal

pronóstico en el cáncer de mama, coincidiendo con estudios previos (Chantrain et al Cancer Res 2009)(Li HC et al Breast Cancer Res Treat 2004). La alta expresión de MMP-1 por los fibroblastos se correlacionó con la aparición de metástasis (Vizoso FJ, Gonzalez LO, Corte MD, Rodríguez JC, Vázquez j, Lamelas MI, Junquera S, Merino AM, García-Muñinz JL. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cáncer. Br J Cancer 2007;96(6):903-11), que confirma resultados de estudios previos que muestran que esta MMP se asocia con una capacidad de metástasis elevada (Kang et al Cancer Cell, 2003)(Prybylowska et al Breast cáncer res treat 2006).

La MMP-7 es una estromelisina que degrada el colágeno tipo IV, la fibronectina y la laminina. Se han publicado varios estudios que demuestran que la MMP-7 en una forma aberrante se expresa en los tumores de mama humanos, y que la eliminación de MMP-7 se relaciona con baja capacidad de invasión y crecimiento tumoral lento. (Jian et al. Clinical cáncer res 2005) Elevados niveles intratumorales de MMP-7 se asociaron con distintos parámetros indicativos de agresividad tumoral, y con elevada incidencia de metástasis a distancia (Vizoso FJ, Gonzalez LO, Corte MD, Rodríguez JC, Vázquez j, Lamelas MI, Junquera S, Merino AM, García-Muñinz JL. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cáncer. Br J Cancer 2007;96(6):903-11).

Los estudios de Vizoso y colaboradores también demostraron que la MMP-11 se expresa de forma preferente en células del estroma peritumoral (Basset et al. Crit rev Oncol Hematol 1997) y elevados niveles de su expresión se asociaron con mayor progresión tumoral y peor pronóstico (Chenard et al Int J Cancer 1996)

La MMP-13 (colagenasa-3) tiene una amplia especificidad de sustrato al compararse con otras MMP (Knauper et al J Biol Chem 1997). Parece que tiene un papel central en la cascada de activación de MMP, al activar y ser activada por otras MMPs. Vizoso y colaboradores encontraron una alta expresión de MMP-13 en tumores en fase inicial, pero también se asoció a los tumores más infiltrantes y con mayor tasa de metástasis a distancia, cuando la MMP se expresó en células fibroblásticas o células inflamatorias mononucleares (Vizoso et al. Br J Cancer 2007)

La MMP-14, implicada en la degradación de la matriz extracelular, activa pro-MMP-13(Knauper et al J Biol Chem 1996) y pro-MMP-12 (Strogin et al J Biol Chem 1995) en la superficie celular, desempeñando funciones clave en la carcinogénesis molecular, el crecimiento de las células tumorales, invasión, y angiogénesis. Vizoso y col encontraron asociación de la MMP-14 con factores clínicopatológicos de mal pronóstico indicativos de agresividad tumoral . Describieron una fuerte asociación entre la expresión de MMP-14 por las células del estroma y el mal pronóstico (Vizoso et al. Br J Cancer 2007)

TIMP-1 y TIMP-2 se asociaron de forma significativa con varios parámetros indicativos de agresividad tumoral así como con elevada incidencia de metástasis a distancia (Schrohl et al. Clin Cancer Res 2004)

Los resultados también muestran que la expresión de algunas MMP y TIMP tienen un potencial valor como factor predictivo de metástasis a distancia, sin afectación ganaglionar. Encontrando, por el contrario, que la expresión global de MMP-13 y TIMP-2 correlacionó negativamente con afectación de los ganglios. Estos datos apoyan el concepto de que el mecanismo involucrado en la diseminación linfática y vascular depende de diferentes procesos dentro de la fisiopatología tumoral (Vizoso et al. Br J Cancer 2007).

En resumen, todos estos estudios demuestran la importancia de las MMPs y los TIMPs en la progresión del cáncer de mama y sugiere su valor potencial para llegar a una estimación pronótica más precisa en el carcinoma ductal infiltrante de mama (Vizoso et al. Br J Cancer 2007).

En base a estos resultados, mostrados en un tumor con algunas similitudes epidemiológicas y de dependencia hormonal en el sexo femenino, con el cáncer de próstata y las evidencias previas que relacionan la expresión de MMP con tumores de alto grado y factores de mal pronóstico en el cáncer de próstata, se ha querido evaluar el posible impacto como factor pronóstico de recidiva la expresión de algunas MMPS

(1, 2, 7, 9, 11, 13 y 14) y sus TIMPs (1, 2 y 3) en las células tumorales de cáncer próstata de pacientes con cáncer de próstata clínicamente localizado.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El cáncer de próstata es el tumor más frecuente en el hombre, siendo la prevalencia tan elevada que podría considerarse como un fenómeno normal relacionado con la edad. (Hughes C, Murphy A, Martin C, Sheils O, O'Leary J. Molecular pathology of prostate cancer. J Clin Pathol 2005; 58: 673-684) La supervivencia de pacientes tratados con intención curativa, como es la prostatectomía radical, supera en la mayoría de los casos los 15 años. Sin embargo, un porcentaje significativo de pacientes presentarán recidiva bioquímica o clínica (local o a distancia) durante el seguimiento.

Dada la heterogeneidad en la presentación del cáncer de próstata, a lo largo del tiempo, se han desarrollado distintos sistemas de predicción de la evolución de los pacientes sometidos a prostatectomía radical basados en nomogramas sobre factores clínicos, que en muchas ocasiones son laboriosos en su aplicación y susceptibles de error.

Hasta ahora la causa de esta heterogeneidad es desconocida, por lo que son necesarios marcadores que permitan identificar pacientes con riesgo de desarrollar cáncer de próstata o padecer tumores de próstata agresivos que puedan ser tratados con estrategias más radicales. Las nuevas técnicas de análisis molecular permiten estudiar múltiples factores moleculares con bajo coste y de manera rápida.

Tanto las metaloproteasas como sus inhibidores tisulares han demostrado tener un importante papel en la evolución y agresividad de distintos tumores, así como en la proliferación de las células tumorales o la inhibición de su apoptosis, respectivamente.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Usando una metodología basada en micromatrices tisulares se ha permitido el desarrollo de modelos predictivos para el cáncer de mama a lo largo de distintos estudios. Teniendo en cuenta estos resultados y los antecedentes expuestos en la introducción, los objetivos del presente trabajo son:

1. Determinar la expresión de metaloproteasas 1, 2, 7, 9, 11, 13, 14 y de sus inhibidores tisulares 1, 2 y 3, en células tumorales de piezas de prostatectomía radical en pacientes con cáncer de próstata, neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e hiperplasia benigna de próstata (HBP).
2. Definir una puntuación válida y específica para la expresión de dichas MMPS y TIMPS en las células tumorales de cáncer de próstata.
3. Relacionar la expresión de MMPS y los TIMPS en células tumorales de pacientes con cáncer de próstata con las características clínico patológicas de estos tumores.

4. Examinar la evolución del cáncer de próstata en nuestra serie, considerando la recidiva bioquímica (incremento de los niveles séricos de PSA) y/o clínica, en función de la expresión de las MMPS y sus inhibidores en células tumorales.

5. Buscar un fenotipo en las células tumorales, en relación con las MMPS y TIMPS citados con diferentes implicaciones pronóstica.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo y ciego respecto a las determinaciones histológicas de los marcadores.

PACIENTES Y MUESTRAS TISULARES

Pacientes

Selección de pacientes

Se seleccionaron 133 pacientes con adenocarcinoma de próstata localizados clínicamente y sometidos a prostatectomía radical (47 con recidiva bioquímica y 66 sin recidiva), 20 con PIN y 50 con HPB. Cuyas edades se reumen en la tabla M1.

Los pacientes fueron seleccionados de la consulta ambulatoria por sintomatología relacionada con agrandamiento prostático o por controles rutinarios de PSA.

Tabla M1: Rango de edad de los pacientes incluidos.

DIAGNÓSTICO	Rango de edad (años)
Adenocarcinoma de próstata localizado (prostatectomía radical)	44-79
PINAG	54-70
HBP	54-70

Indicación de biopsia

Se indicó la biopsia de próstata, según los criterios de las guías europeas de cáncer de próstata ^(Guidelines año?), cuando el valor de PSA se encontraba en valores superiores a 3.5 ng/ml, según el valor de referencia de nuestro laboratorio, o con tacto rectal sospechoso.

La biopsia prostática se realizó dirigida por ecografía transrectal, tomándose al menos seis cilindros en total, distribuidos mapeando la próstata.

Tratamiento

De aquellos pacientes en los que la biopsia fue positiva para adenocarcinoma de próstata, se seleccionaron como candidatos a prostatectomía radical los que se encontraban en un estadio localizado de la enfermedad, esto es cT2 o menor, y en los que por presentar un PSA < 20 ng/ml o por pruebas de imagen (TC, gammagrafía ósea) no se sospechase enfermedad ganglionar ni metastásica.

Los pacientes fueron tratados según las recomendaciones de nuestro centro.

En todos aquellos pacientes que fueron candidatos a prostatectomía radical esta se realizó por acceso retropúbico según la técnica de Walsh, procurando la exéresis completa de la próstata con las vesículas seminales, desde la uretra membranosa hasta el cuello vesical. Se conservaron los haces neurovasculares posterolaterales de la próstata bilateralmente en aquellos pacientes en los que fue técnicamente posible y que tuvieran un Gleason igual o menor a 6, fueran cT2a o menores y con PSA menor de 10 ng/dl, la conservación fue unilateral si el estadio clínico fue cT2b y no se realizó si el Gleason era mayor de 6, el PSA mayor de 10 ng/dl o era cT2c o mayor. Se realizó linfadenectomía desde la fosa obturatriz como límite inferior, hasta la bifurcación de las iliacas y medialmente hasta el nervio obturador, en los que tenían un PSA mayor de 10 ng/ml o tenían un Gleason en la muestra de la biopsia igual o mayor a siete.

Seguimiento

Los pacientes sometidos a prostatectomía radical fueron seguidos durante un mínimo de cinco años, en los casos que no presentaron recidiva bioquímica.

Consideramos aparición de recidiva bioquímica cuando el PSA ascendía por encima de 0.2 ng/ml, en dos determinaciones consecutivas. La primera determinación de niveles de PSA se realizó al mes de la cirugía, la segunda a los 3 meses, y a partir de ese momento se controlaba cada tres meses.

De los 133 pacientes, 47 presentaron recidiva bioquímica, se recogió en estos casos el tiempo hasta la recidiva, tipo de recidiva (local o a distancia), PSA, presencia de masa local, localización y número de metástasis. Todos los pacientes fueron evaluados cada 6 meses mediante exámenes clínicos, radiológicos y biológicos, tanto para evaluar la recurrencia de la enfermedad como el estado de supervivencia. La media de seguimiento fue de 62 meses (rango entre 6 y 144 meses).

Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión para la selección de los pacientes fueron:

- Enfermedad diseminada en el momento de presentación
- Historia previa de cualquier tipo de tumor.
- Haber recibido cualquier tipo de terapia neoadyuvante.
- Desarrollo de un segundo tumor primario.

- Ausencia de suficiente cantidad de tejido en los bloques de parafina para manufacturar las matrices tisulares.

Variables registradas

En todos los casos se recogieron:

- Datos de filiación del paciente
 - Nombre
 - Edad
 - Número de historia clínica
 - Número de la biopsia
- Factores pronósticos tradicionales pre tratamiento
 - Estadio clínico
 - PSA pre tratamiento
 - Grado de Gleason de la biopsia
 - Número de cilindros afectados
- Otros parámetros
 - Tacto rectal
 - Volumen prostático
 - Fecha de realización de la biopsia
 - Biopsia única o múltiple.
 - Índice de PSA libre/PSA total en aquellos que presentasen un PSA menor de 10 ng/ml
 - Patrón de Gleason primario vs secundario
 - Localización de las biopsias positivas
 - Presencia o no de PIN de alto grado asociado

- Invasión perineural y/o de las vesículas seminales en los casos que fue posible determinarlo *a priori*.
- Existencia de TC o gammagrafía ósea previa al tratamiento
- Datos de la cirugía
 - Fecha de realización
 - Presencia o no de complicaciones postoperatorias
- Datos anatomopatológicos
 - Estadio pT
 - Patrón de Gleason
 - Presencia de PINAG y/o invasión perineural o de las vesículas seminales
 - Afectación de los bordes quirúrgicos
 - Afectación ganglionar patológica en caso de que existiese
- Datos del tratamiento y evolución
 - Tratamiento ofrecido
 - Progresión o cese la misma posterior a la recidiva
 - Estado actual del paciente
 - PSA postratamiento

Muestras tisulares

Clasificación de los tumores

Los tumores se estadificaron de acuerdo con los criterios del *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*^{(Flemming I, Cooper I, Hemson D (1997) The}

1992 TNM Classification. American Joint Committee on Cancer Staging Manual 5Th edn, JB Lippincott: Philadelphia 219-222). El grado histológico fue establecido según los criterios de Gleason^(Gleason DF.: Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In.: Tannenbaum M., ed. Urologic pathology: The prostate. Philadelphia, PA.: Lee and Febiger 1977: 171-198)

PSA sérico

Los valores séricos del PSA fueron determinados, preoperatoriamente y postoperatoriamente, utilizando el test “*Elecys*” *immune-assay* (Roche Diagnostic GMBH, Mannheim, Germany).

Muestras histológicas

Como se ha dicho el material histológico empleado para este estudio se obtuvo de las piezas quirúrgicas procedentes de 133 pacientes con cáncer de próstata localizado sometidos a prostatectomía radical, 20 pacientes con neoplasia intraepitelial de alto grado (PINAG) procedentes de biopsia de próstata y de 50 pacientes con hiperplasia benigna de próstata (HBP) obtenidas mediante resección transuretral de la próstata (RTUp).

MÉTODOS

Selección de bloques de parafina para el estudio inmunohistoquímico

Para la realización de mallas de tejido se seleccionaron zonas del área central del tumor primario con objeto de evaluar el estroma intratumoral y otras del área periférica tumoral, para evaluar el estroma de la frontera tumoral y el estroma peritumoral. También se obtuvieron muestras de las áreas inflamatorias en los pacientes con patología benigna.

Elaboración de las mallas de tejido (*Tissue Arrays*)

Todas las muestras que se utilizaron en este trabajo fueron fijadas en formaldehído al 10% según la rutina de nuestro laboratorio de Anatomía Patológica. Se incluyeron en parafina a temperatura ambiente y posteriormente fueron almacenadas por un tiempo variable entre cuatro meses y cinco años antes de realizar la prueba.

Para el estudio se seleccionaron las áreas más representativas del tumor, se realizó una tinción con Hematoxilina-Eosina y se marcaron las zonas elegidas sobre los cristales de las muestras histológicas.

Para la elaboración de las mallas de tejido, llevada a cabo por patólogos con experiencia en el proceso (Dr Luis Ovidio González y Dr Antonio Martínez Merino, Hospital de Jove) se seleccionaron las zonas no necróticas del tumor. En cada bloque se puncionaron las áreas seleccionadas y se obtuvieron dos cilindros de 1.5mm de diámetro. Estos cilindros se introdujeron en un bloque receptor de parafina vacío. Para llevar a cabo esta labor se usó el *Manual Tissue Arrayer MTA I* (Beecker Instruments, Sun Praerie, WI, USA)

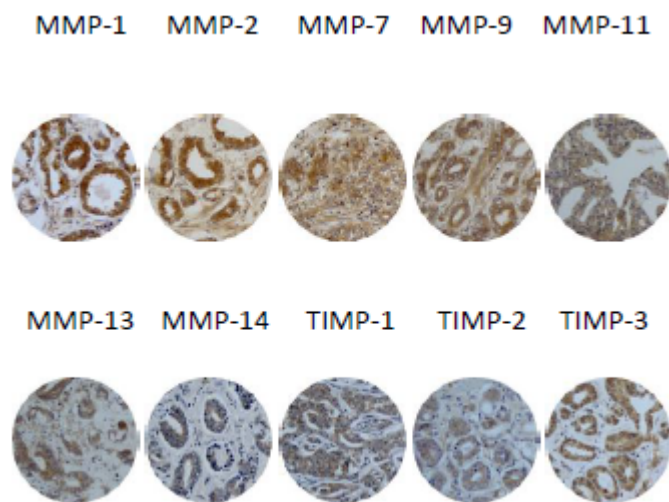
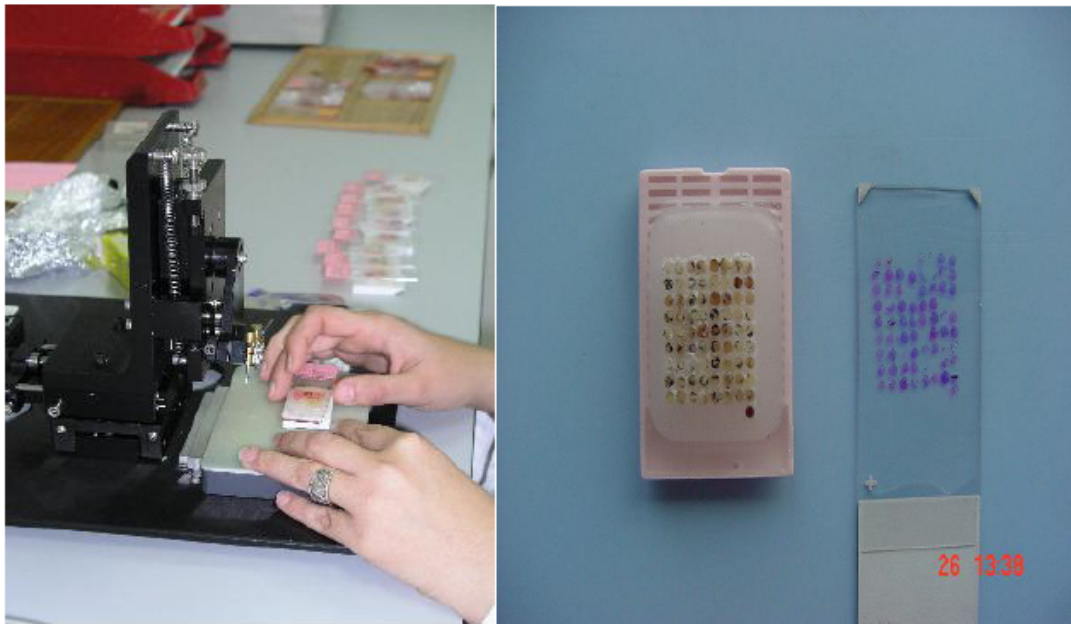


Figura 2. Elaboración de mallas tejido de muestras de cáncer de próstata y ejemplos de tinciones inmunohistoquímicas para cada proteína.

Se obtuvieron cuatro cilindros del tumor primario en cada caso, dos de ellos correspondían al área central del tumor y otros dos a la frontera tumoral. Se definió la frontera tumoral como el área de avance tumoral, correspondiente a los 2 mm de margen que rodean el tumor y contienen células tumorales.

De cada bloque se obtuvieron secciones de 5 μm de espesor, cortadas consecutivamente con un microtomo automatizado (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) y que posteriormente se transfirieron a un portaobjetos con superficie adherente. En una sección de cada bloque se realizó una tinción con Hematoxilina-Eosina para confirmar que la muestra era representativa del tumor original.

Análisis inmunohistoquímico

La inmunohistoquímica se llevó a cabo en las secciones tisulares fijadas con formaldehído tamponado al 10% y sumergidas en parafina, usando un inmunoteñidor automático (TechMate TM50 autostainer, Dako, Glostrup, Denmark)

Los anticuerpos contra las MMPs y TIMPs se obtuvieron de la marca Neomarker (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA). La dilución de cada anticuerpo se estableció en base a los controles negativos y positivos suministrados por el laboratorio (1/50 para MMP 2, 7 y 14, y TIMP 2 y 3; 1/100 para MMP 1, 9 y 13, y TIMP 1; y 1/200 para MMP 11).

Por otro lado se utilizaron, de forma complementaria, anticuerpos contra citoqueratinas y vimentina, con el objetivo de distinguir los fibroblastos de las células tumorales.

Se usó un sistema de tinción para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo se usó el EnVision Detection Kit (Dako) que incorpora diaminobencidina como cromógeno. Las secciones fueron contrastadas con hematoxilina, deshidratadas con etanol y montadas definitivamente.

Las secciones tisulares fueron deparafinadas en xileno, y rehidratadas en concentraciones decrecientes de alcohol etílico (100%, 96%, 80%, 70% y agua). Para mejorar la recuperación de los antígenos de interés las secciones fueron tratadas elevando la temperatura con un microondas (H2800 Microwave Processor, EBSciences East Granby, CT, USA) en un buffer citrato (Target Retrieval Solution, Dako) a 99°C durante 16 minutos. La actividad endógena de la peroxidasa fue bloqueada incubando los portaobjetos en solución con bloqueante de peroxidasa (Dako) durante 5 minutos.

Las muestras están procesadas mediante métodos de rutina específicos para el diagnóstico histológico y análisis inmunohistoquímico. Se utilizarán muestras correspondientes a los cilindros prostáticos obtenidos en las biopsias, donde se analizarán de forma selectiva un número reducido de MMPs y TIMPs de interés. En cambio, en las muestras obtenidas de especímenes quirúrgicos, debido a su mayor disponibilidad de cantidad de tejido, se realizará un estudio más completo de las MMPs y TIMPs, sobre mallas de tejido.

Se realizarán análisis inmunohistoquímicos con objeto de evaluar la expresión de las proteínas por los distintos tipos celulares. Realizaremos

estos análisis por el método del polímero conjugado, y utilizando anticuerpos específicos contra cada una de ellas. Cabe señalar que en algunos casos utilizaremos doble sistema de tinción inmunohistoquímica, de cara a evaluar la coexpresión de factores por los tipos celulares.

Para las determinaciones inmunohistoquímicas, se establecerá un orden combinado de las diferentes determinaciones de factores de acuerdo a los distintos cortes histológicos de cada muestra tisular, de tal forma que ello nos permita evaluar las posibles asociaciones de los distintos factores en cada subpoblación de células.

Análisis estadístico

En lo referente al análisis estadístico los resultados de los parámetros determinados en los tumores serán presentados como variables cualitativas y/o cuantitativas (continuas). Estas dos formas de evaluación pueden ser aplicadas a las técnicas empleadas en el presente proyecto. Además, se estudiarán tanto el tipo celular (célula inflamatoria/célula tumoral) responsable de las distintas expresiones proteicas, como su localización central o periférica en los tumores, tratando de definir los diferentes fenotipos del estroma tumoral.

Se analizará la posible relación entre todos los parámetros del estudio y se aplicarán análisis estadísticos paramétricos o, en su caso, no paramétricos, curvas de supervivencia, y análisis multivariantes. Así, se tratará de definir el valor de cada factor analizado individualmente, o

combinaciones de ellos, de cara a identificar con mayor potencia el perfil predictivo.

Las diferencias en porcentajes fueron calculadas con el test de χ^2 . Los valores de inmunotinción para cada proteína se expresan como una mediana (rango). La comparación de los valores de inmunotinción entre grupos fue hecha con los test de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. Para el análisis de supervivencia libre de metástasis se usó el método univariante de Cox. El modelo de regresión de Cox se usó para examinar interacciones de distintos factores pronósticos en análisis multivariante.

Además, utilizaremos el “análisis bidimensional de conglomerados jerárquico” con el programa “Cluster 3.0” (Universidad de Stanford) para identificar los diferentes fenotipos de expresión de los factores en los diferentes tipos celulares. Este método organiza las proteínas en una estructura de árbol, en función de su similitud. Los datos se codificaron como siguen:

- (-3)= tinción negativa
- (+3)= tinción positiva
- Los datos perdidos se dejaron en blanco.

Los valores de puntuación fueron recodificados (postivo-negativo) eligiendo la mediana como punto de corte.

Para la realización de los cálculos se utilizó el programa SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA), las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativos cuando la p era igual o menor a 0,05.

Consentimiento informado

Todos los datos serán tratados manteniéndose la confidencialidad de acuerdo con la legislación vigente sobre datos de carácter personal. Los pacientes se identificarán únicamente por sus iniciales y un código de inclusión participante en las técnicas.

Todos las pacientes incluidos en el estudio tendrán que haber recibido el documento de información al paciente y firmado el de consentimiento informado, que son específicos para cada tipo de intervención quirúrgica.

Asimismo, todos los pacientes incluidos en el presente estudio tendrán que haber autorizado la utilización de sus muestras tisulares para fines de investigación, de acuerdo con la normativa legal del banco de tumores.

RESULTADOS

RESULTADOS

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

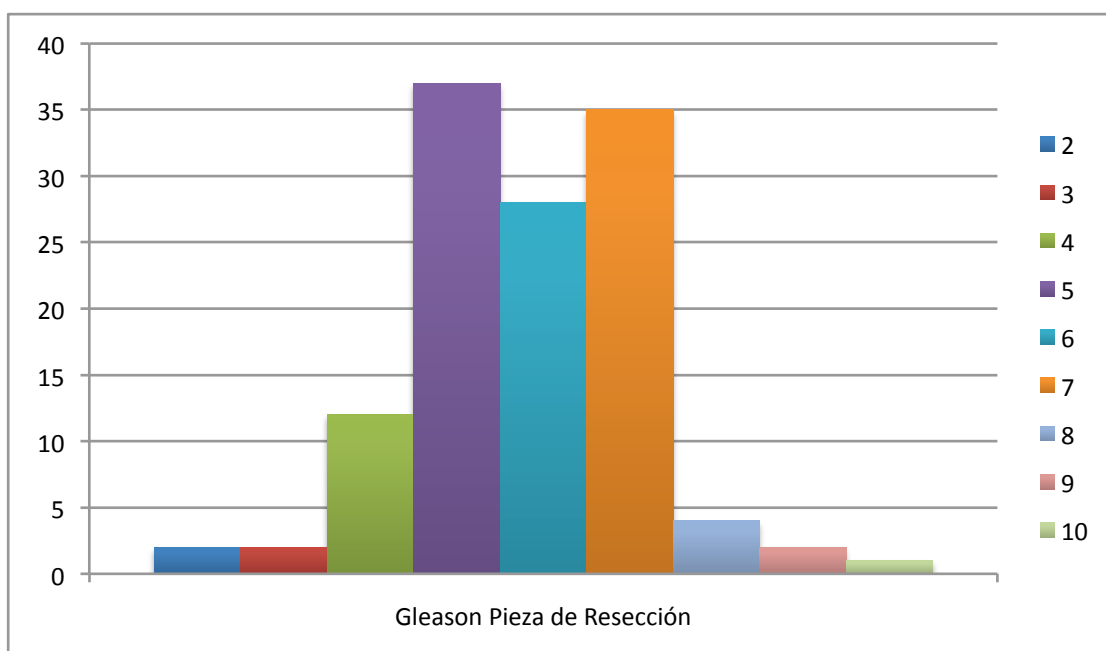
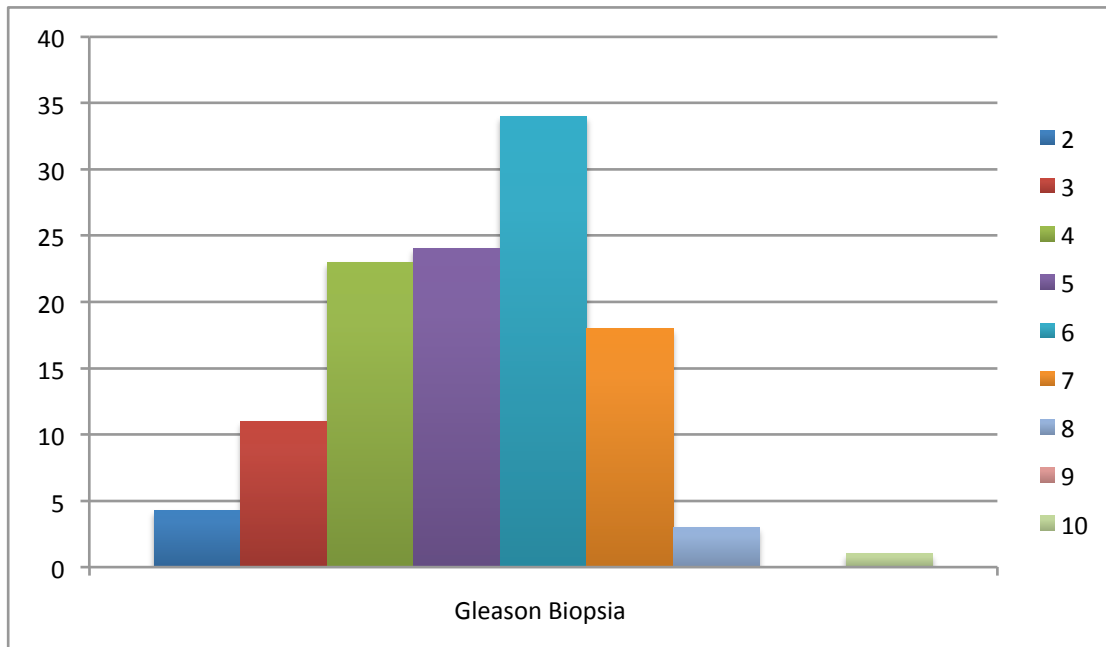
Se llevaron a cabo más de 2600 determinaciones en muestras de carcinoma prostático provenientes de piezas de prostatectomía radical de 133 pacientes con carcinoma de próstata clínicamente localizado. Del mismo modo se analizó la expresión de todas las proteínas en 20 muestras con neoplasia intraepitelial benigna (PIN) y en 50 muestras de hiperplasia prostática benigna.

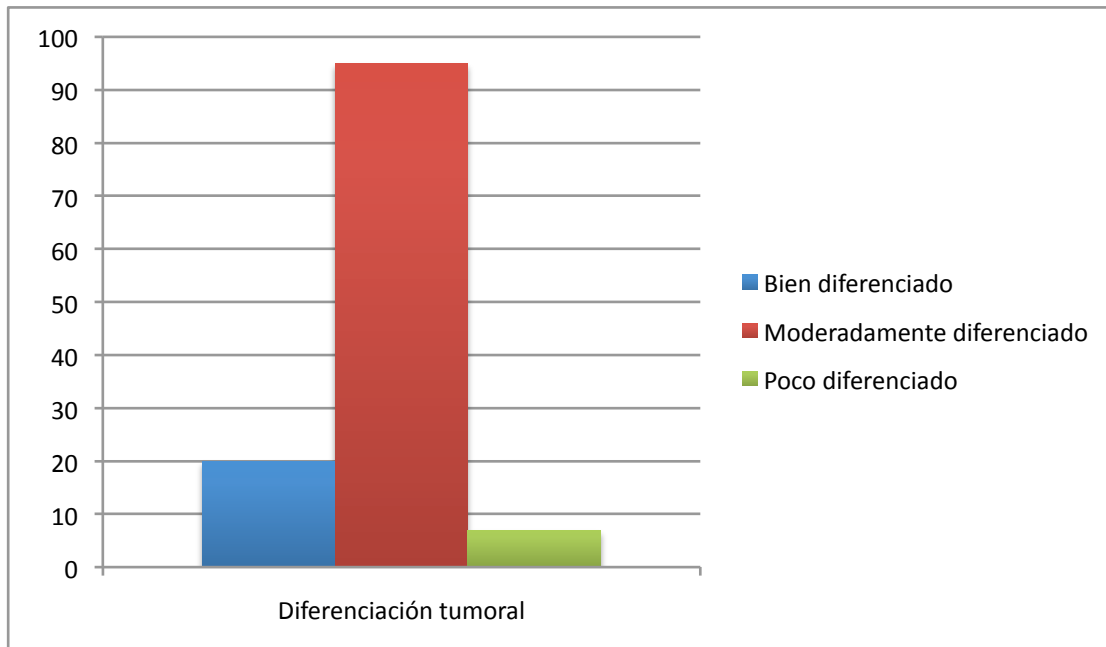
La edad media de la muestra fue de 65.64 años (SD 6.45) y un rango de edad entre los 44 años y los 79 años (tabla R1).

Los niveles séricos de PSA preoperatorio oscilaron entre 3.9 y 31 ng/ml (media 9.19± 5.84 ng/ml). El 69.9% de los pacientes tenía un PSA menor de 10ng/ml al diagnóstico. (tabla R1 n=antes)



El 80% de los pacientes obtuvo un estadio anatomopatológico final pT2 (106 casos) y el 20% obtuvieron un estadio igual o superior a pT3 (27 casos). Según el grado de Gleason hubo 18 pacientes (13.5%) con una puntuación de 2 a 4; 67 pacientes (50.4%) de 5 a 6 y 48 pacientes (36.1%) con Gleason igual o mayor de 7. (tabla R1 n=antes)





Durante el seguimiento se confirmó recidiva bioquímica en 47 de los 133 pacientes (PSA>0.2 ng/ml, confirmado en una segunda determinación).

El seguimiento medio fue de 65.93 meses (SD 27,99) Rango 6-123

La supervivencia libre de enf 48.97 (SD 34.16) Rango 0- 123meses

Tabla R1. Características de los pacientes

CARACTERÍSTICA	N (%)
EDAD (años)	
<=65	80 (60.1)
>65	53 (39.9)
ESTADIO PATOLOGICO	
T2	106 (79.7)
T3-4	27 (20.3)
GRADO DE GLEASON	
2-4	18 (13.5)
5-6	67 (50.4)
7-10	48 (36.1)
PSA preoperatorio (ng/ml)	
<10	93 (69.9)
>10	40 (30.1)

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Los resultados de las tinciones fueron categorizados usando una puntuación basada en la intensidad de la tinción, y el software calculó el porcentaje de inmunotinción celular de manera automática. (FIG nºR1)

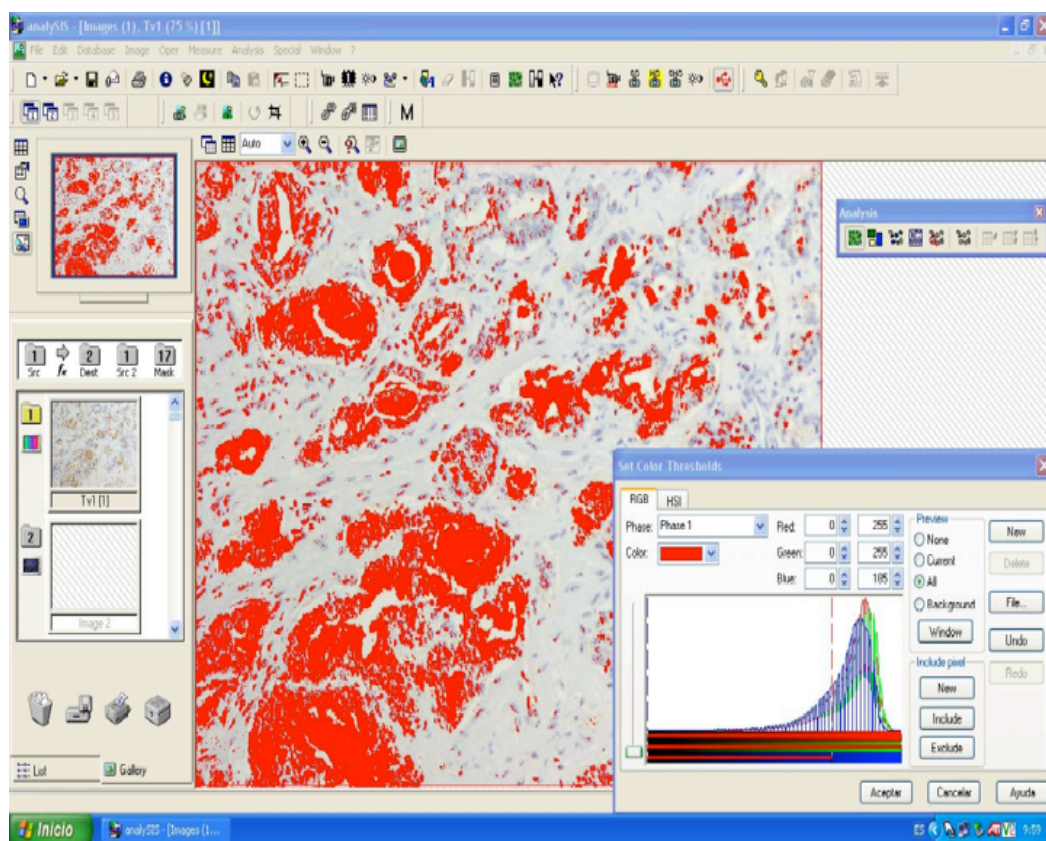


Figura 3. Programa específico de software que calcula automáticamente el porcentaje de células inmunoteñidas

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN GLOBAL DE LAS MMPS y TIMPS EN PATOLOGÍA BENIGNA DE LA PRÓSTATA Y EN CANCER DE PRÓSTATA

Se comparó la expresión de MMPs y TIMPs en las muestras de PIN y HBP con la expresión de las mismas en muestras de carcinoma prostático. Encontramos una expresión significativamente más elevada de los factores en las muestras de carcinoma prostático que en las de patología benigna (PIN o HBP). Sin embargo, no se encontró una diferencia significativa en cuanto a la expresión de la MMP-7 en los tres tipos de lesiones prostáticas (TABLA N° R2)

La figura R2 muestra un ejemplo de expresión de MMP en patología prostática benigna y en carcinoma de próstata.

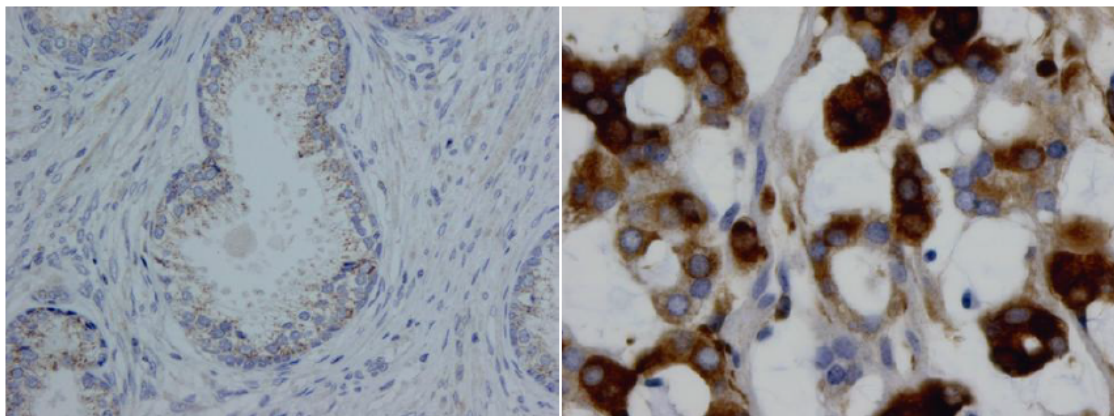


Figura 4. Ejemplo de expresión de MMP-1 en patología prostática benigna y en cáncer de próstata (400x)

Tabla R2: Expresión de las MMPs y TIMPs en las muestras de patología prostática benigna y en carcinoma prostático. Los datos se muestran como número de casos y porcentaje de casos entre paréntesis.

FACTOR	HBP	PIN	CP	P valor
MMP-1	22 (44.4%)	5 (25%)	123 (92.5%)	<0.001
MMP-2	9 (19.4%)	6 (30.4%)	80 (60.2%)	<0.001
MMP-7	32 (62.5%)	17 (85%)	106 (79.7%)	0.243
MMP-9	3 (5.5%)	3 (15%)	90 (69.7%)	<0.001
MMP-11	25 (50%)	11 (55%)	122 (91.7%)	<0.001
MMP-13	3 (6.2%)	10 (50%)	92 (69.2%)	<0.001
MMP-14	9 (18.7%)	2 (10%)	82 (61.7%)	<0.001
TIMP-1	9 (18.7%)	6 (30%)	95 (71.4%)	<0.001
TIMP-2	6 (12.5%)	2 (10%)	81 (60.9%)	<0.001
TIMP-3	28 (56.2%)	12 (60%)	97 (72.9%)	0.037

EXPRESIÓN GLOBAL DE LAS MMPS Y SUS INHIBIDORES EN CARCINOMAS PROSTÁTICOS

Se encontró una amplia variabilidad de los valores de inmunotinción para cada proteína analizada (TABLA R3).

Estos datos respaldan la heterogeneidad biológica del cáncer de próstata respecto a la expresión de aquellos factores implicados en la invasión tumoral y las metástasis, estando implicados en procesos básicos de progresión tumoral, tales como degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular, estimulación de la proliferación celular, motilidad celular, resistencia a la apoptosis y angiogénesis.

Por lo tanto, la variabilidad en la expresión global de MMPs y TIMPs demostrada en nuestro estudio podría estar relacionada con la diversa evolución clínica de los tumores prostáticos, aportando información pronóstica.

Además, estos resultados podrían contribuir a establecer nuevas dianas terapéuticas en el cáncer de próstata, a través de la inhibición enzimática selectiva de las MMPs.

Tabla R3. Valores de inmunotinción para cada proteína analizada.

FACTOR	CP	P valor
	Mediana (rango)	
MMP-1	104.5(0-245.1)	<0.001
MMP-2	42.7(0-239.6)	<0.001
MMP-7	52.7(0-235.5)	<0.001
MMP-9	39.3(0-123.9)	=0.003
MMP-11	111.1(0-275.5)	<0.001
MMP-13	42.2(0-151.7)	<0.001
MMP-14	32.9(0-290)	<0.001
TIMP-1	33.9(0-120.8)	<0.001
TIMP-2	52.16(0-238.8)	<0.001
TIMP-3	43.35(0-238.76)	<0.001

RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GLOBAL DE LAS MMPS Y TIMPS EN CÉLULAS TUMORALES Y CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS EN CANCER DE PRÓSTATA

Analizamos la posible relación entre la expresión de MMPs y TIMPs y factores clinico-patológicos de los carcinomas de próstata, tales como la edad de los pacientes, el estadio tumoral, el grado histológico y los niveles de PSA pre-tratamiento.

Nuestros resultados sólo mostraron asociación significativa de la TIMP-1 con el grado histológico. Se encontró que las muestras que presentaron puntuaciones más elevadas para TIMP-1 tuvieron un mayor porcentaje de casos con grado de Gleason alto ($p=0.036$) (TABLA R4)

Tabla R4: Relación entre la expresión de TIMP-1 por las células tumorales y el grado histológico

CELULAS TUMORALES	GS 2-4	GS 5-6	GS 7-10	TOTAL	p valor
TIMP-1 (-)	4(6%)	36(53.7%)	27 (40.3%)	67 (100%)	0.036
TIMP-1 (+)	14(21.2%)	31 (47%)	21(31.8%)	66 (100%)	

RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GLOBAL DE MMPS Y TIMPS EN CELULAS TUMORALES Y LA RECIDIVA BIOQUÍMICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA LOCALIZADO

Nuestros resultados demostraron una asociación significativa entre la expresión de MMP-11 y MMP-13 y la recidiva bioquímica en pacientes con carcinoma de próstata (elevación postoperatoria de los niveles de PSA por encima de 0.2 ng/ml). Los pacientes con tumores que presentaban valores de puntuación de MMP-11 y MMP-13 superiores a la mediana tenían una probabilidad significativamente mayor de recurrencia bioquímica que aquellos pacientes con expresión de MMP-11 o MMP-13 inferiores ($p=0.02$ Y $p=0.001$, respectivamente).

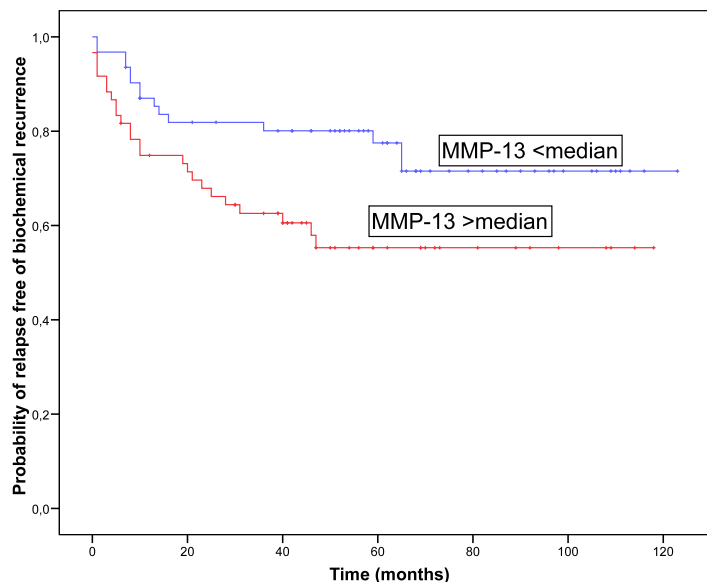


Figura R3: Probabilidad de recidiva bioquímica en función de la expresión de MMP-13 en las células tumorales ($p=0.02$). MMP-13 negativa (azul), MMP-13 positiva (rojo).

Por otro lado, la expresión de MMP-2 por células tumorales se asoció significativamente con menor probabilidad de recidiva bioquímica en pacientes con cáncer de próstata ($p=0.02$).

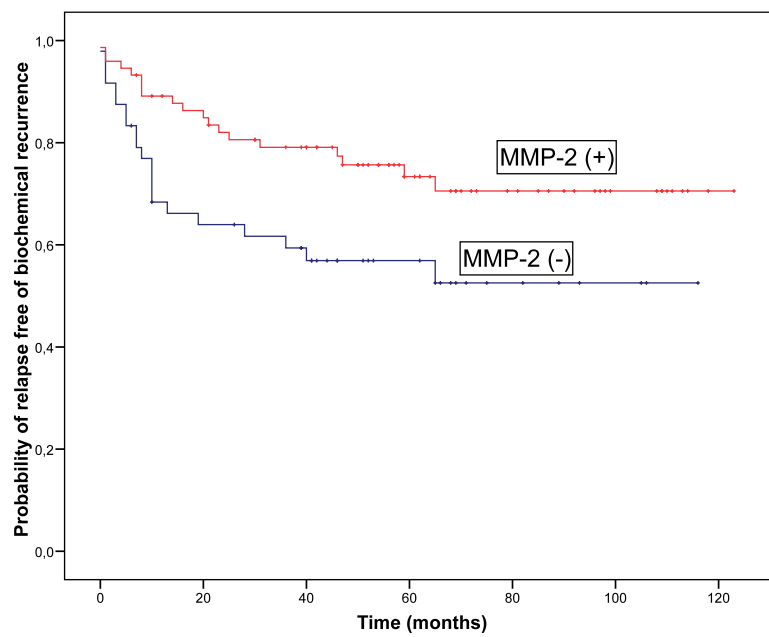


Figura R4: Probabilidad de recidiva bioquímica en función de la expresión de MMP-2 por células tumorales en pacientes con cáncer de próstata.

IDENTIFICACION DE DIFERENTES FENOTIPOS EN LA EXPRESIÓN DE MMPs Y TIMPs EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Para identificar grupos específicos de tumores con distintos perfiles de expresión inmunohistoquímica de MMP/TIMP los datos fueron analizados mediante análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado, por los valores de puntuación y por cada tipo celular estudiado. El método de agrupamiento jerárquico no supervisado organiza las proteínas en una estructura de árbol, en base a su similitud. Los datos fueron reagrupados de la siguiente manera: -3 designando tinción negativa y 3 tinción positiva, dejando en blanco los datos que falten. Los valores de puntuación se reestructuraron (positivo-negativo). Se eligió la mediana como punto de corte. Se utilizó el programa Cluster Server 3.0 (vinculación media, correlación de Pearson) (de Hoon et al 2004). Los resultados se muestran con TreeView (Eisen et al 1998). El algoritmo ordena las proteínas en el eje horizontal y las muestras en el eje vertical basándose en la similitud de sus perfiles de expresión.

Cuando consideramos los casos dicotomizados con respecto a su valor de puntuación usando el valor de la mediana para cada MMP o TIMP como punto de corte, esto produjo un dendrograma que mostraba una división de primer orden de tumores en dos perfiles moleculares

MMP/TIMP diferentes, uno designado como grupo 1 con alta expresión de MMPS/TIMPS (n=70) y el otro designado como grupo 2 (n=63) con baja expresión de MMP/TIMPS.

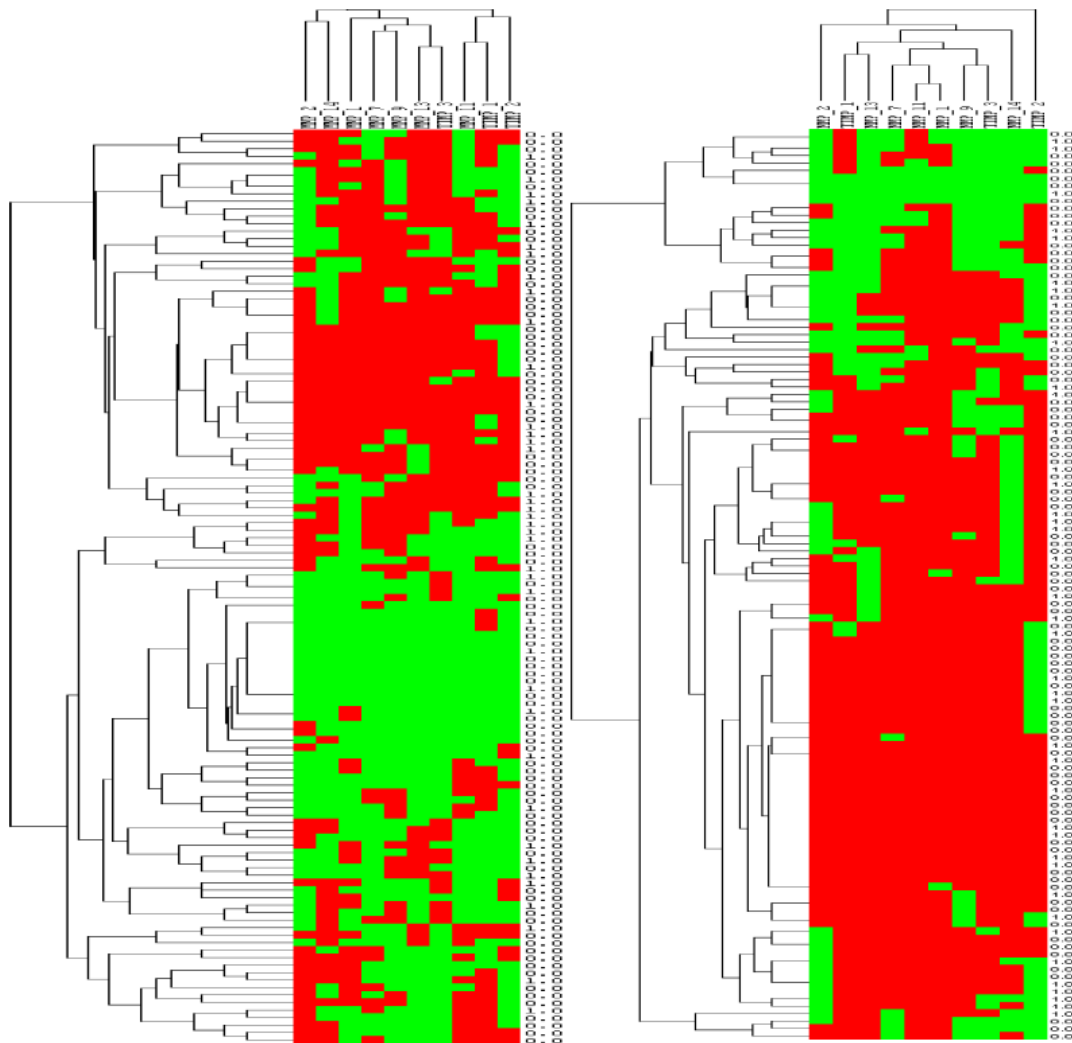


Figura 5. Representación gráfica del dendrograma para valores globales (A) y en las células tumorales (B).

Por lo tanto, es posible identificar dos fenotipos de carcinoma de prostático respecto a la expresión global de MMPs/TIMPS o con respecto a la expresión de estos factores por las células tumorales, lo cual podría ser relevante para el desarrollo de terapias basadas en la inhibición de MMPs.

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en el pronóstico entre los dos grupos de pacientes correspondiendo a dos tipos de tumores clasificados de acuerdo con el perfil molecular de expresión MMPs/TIMPS en base al valor de la mediana dado por este factor. (TABLA R5) Así, durante el período del estudio la recidiva bioquímica fue confirmada en 31 de los 70 pacientes del grupo 1 de tumores (44,3%) y sólo en 16 de 63 pacientes del grupo 2 (25,4%).

El análisis de Kaplan-Meier mostró que la diferencia en la supervivencia libre de recidiva entre estos dos grupos es estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Los resultados no indican asociación entre las agrupaciones clínicas y patológicas de los carcinomas de próstata, lo cual sugiere el valor de esta clasificación como factor pronóstico independiente.

El análisis multivariante de acuerdo al modelo de Cox demostró que el estadio tumoral (pT 3-4: riesgo relativo, $RR=3.38$; 95% intervalo de confianza, $CI=1.7-6.5$; $p < 0.0001$) y el grado de Gleason (GS 7-10: 2.08 (1.1-3.9); $p < 0.05$) fueron significativa e independientemente asociados a recidiva bioquímica. Este mismo análisis también demostró que la

expresión de MMP-13, así como el agrupamiento de puntuaciones, fueron factores independientes asociados con la recidiva bioquímica en pacientes con carcinoma prostático.

TABLA R5: Análisis de Cox univariante (HR) y multivariante (RR) de la relación entre la expresión de MMPS y TIMPSy la supevivencia libre de recidiva. (p<0.005; ***p<0.001; *p<0.05)**

FACTOR	FRECUENCIA EVENTO	HR (95% IC)	RR (95%IC)
MMP-1	21/26	1.1 (0.6-2)	1.2(0.7-2.2)
MMP-2	28/19	0.6 (0.3-1)	0.6 (0.3-1.2)
MMP-7	18/29	1.7(0.9-3)	1.3 (0.7-2.3)
MMP-9	19/28	1.6 (0.9-2.9)	1.2 (0.6-2.2)
MMP-11	15/32	2.5 (1.3-4.7)**	1.8 (0.9-3.4)
MMP-13	14/33	2.7 (1.4-5.2)***	2.6 (1.4-5)**
MMP-14	18/29	1.6 (0.9-2.9)	1.5 (0.8-2.7)
TIMP-1	20/27	1.5 (0.8-2.8)	1.3 (0.7-2.5)
TIMP-2	19/28	1.5(0.8-2.8)	1.1 (0.6-2.1)
TIMP-3	21/26	1.3 (0.7-2.3)	1.2 (0.6-2.2)
CLUSTER 1 vs CLUSTER 2	16/31	1.9 (1-3.5)*	1.7 (0.9-3.2)*

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El cáncer de próstata es uno de los tumores malignos más frecuentes tanto en incidencia como en prevalencia. Los datos epidemiológicos estimaban una incidencia de aproximadamente 400.000 casos nuevos solo en Europa en 2012, con un total superior al millón de casos nuevos registrados en todo el mundo (<http://gco.iarc.fr/>). En España, las cifras absolutas para el año 2012 estimaban 27.853 casos nuevos, siendo la tercera causa de mortalidad por cáncer en hombres en nuestro país (5481 muertes por cáncer de próstata), por detrás del cáncer de pulmón y el colorrectal (<http://gco.iarc.fr/>). A la luz de estos datos podemos aseverar que nos encontramos ante una patología en la que la investigación de nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos se revela de extrema importancia. Por lo tanto, existe un gran interés en identificar marcadores moleculares que mejoren el poder predictivo de las actuales técnicas diagnósticas clínico-patológicas y que ayuden a predecir el riesgo de malignización o metástasis en pacientes con carcinoma prostático.

Al comparar los datos de nuestra serie con los datos de las series revisadas en la bibliografía encontramos que la edad media de

presentación del cáncer de próstata es similar. Se obtiene una edad media al diagnóstico en la séptima década de vida (66.1±7.7 años). Respecto al seguimiento tras prostatectomía radical, se encuentra una recidiva bioquímica o clínica de la enfermedad en un 35% de los casos estudiados con una mediana de seguimiento de 62 meses (5 años) de acuerdo con las series estudiadas (Walsh PC, PArtin AW, Epstein JI. Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years. J Urol 1994 Nov; 152 (5 Pt 2): 1831-6) (Kupelian et al Urology 1996) (van de ouden D Br J Urol 1997) (Gil P congreso nacional urología 2001) (Sanchis-Bonet A et al. 2015)

En cuanto a la correlación clinicopatológica final con el estadio clínico previo a la cirugía, se encontró que en el 79% de los casos se trataba de un cáncer de próstata localizado (pT2o menor). Por lo tanto, en un 21% de los casos el estadio patológico fue mayor que el estimado por los parámetros clínicos, hecho que se ha propuesto como una de las causas de fallo de nomogramas predictivos de tratamiento o pronóstico. En una revisión de grandes series americanas de prostatectomía radical se recogen datos de infraestadificación clínica en torno al 24% y de supraestadificación hasta en 33% de casos (Grossfeld GD J Urol 2001). En series de casos españolas se habla de un grado de concordancia biopsia-prostatectomía radical en torno a la mitad de los casos, con una infraestadificación que afectaría a 1 de cada 3 pacientes aproximadamente (Rodríguez Faba O. Arch Esp Urol 2003)(Algaba Arrea F Actas Urol Esp 2004)

Aunque es frecuente encontrar una estadificación patológica acorde a la estadificación clínica, un porcentaje no desdeñable de pacientes

puede estar infraestadiado y, por lo tanto, no ser subsidiario del tratamiento que mejor se adapte a sus necesidades patológicas. Es necesario buscar nuevos marcadores pronósticos, más fiables, para poder prevenir esta situación.

Actualmente, el PSA sigue siendo el principal biomarcador, y por lo tanto, el más utilizado, para el cribado del cáncer de próstata, a pesar de que numerosos estudios han demostrado su limitada precisión diagnóstica (Harvey P et al. BMC Urol 2009). La sensibilidad del PSA para detectar el riesgo de metástasis es alta, pero la especificidad de la prueba es menor de lo deseable y conduce a un aumento del número de biopsias de próstata, con gran proporción de resultados negativos (Vickers AJ et al. BMJ 2013)

En nuestra serie el 69% de los pacientes tenía al diagnóstico un PSA menor de 10 ng/ml. A pesar de la baja especificidad y el bajo valor predictivo positivo el PSA se mantiene en la primera línea en el cribado de cáncer de próstata y la indicación de biopsia (Vickers AJ et al. BMJ 2013)

Resultados de estudios clínicos aleatorizados muestran que realizar la determinación del PSA conduce a un sobrediagnóstico y, por ende, a un sobretratamiento (Andriole GL et al. New Engl J Med 2009). Además, hay que tener en cuenta que cada biopsia de próstata que se realiza de manera innecesaria supone un riesgo real para el paciente. Todos estos datos hacen pensar que se necesitan biomarcadores que puedan predecir con mayor precisión el riesgo de padecer cáncer de próstata significativo.

A lo largo de los últimos años han ido apareciendo nuevos biomarcadores como el PCA3, el PHI, el test 4kScore, o la utilización de la resonancia magnética nuclear para realizar biopsias de próstata dirigidas, pero ninguno ha alcanzado aun un uso clínico generalizado. Estas pruebas tienen como objetivo mejorar la precisión en la estratificación del cáncer de próstata, e identificar los pacientes con alto riesgo de mortalidad específica por cáncer de próstata.

Gracias al conocimiento actual del comportamiento biológico del cáncer de próstata y al desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular el poder conseguir un biomarcador más preciso y fiable es cada vez un logro más cercano.

Las recomendaciones actuales de las Guías Europeas sobre Cáncer de Próstata hacen un especial hincapié en realizar un correcto diagnóstico del tipo de recidiva, sea local o a distancia, para poder pautar un tratamiento individualizado en cada caso, donde siempre se tenga en cuenta el estado del paciente y la clínica que presente. En nuestra serie de casos hemos seguido las pautas de tratamiento recomendadas por la Asociación Europea de Urología, con un abordaje multidisciplinar y secuencial para todos los pacientes.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE MMPS Y TIMPS EN PATOLOGÍA BENIGNA Y EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Nuestros resultados claramente demuestran una mayor expresión de MMPs y TIMPs en el carcinoma prostático respecto a las muestras de patología benigna (PIN y HBP). La mayor expresión de MMPS y TIMPs en las muestras de carcinoma prostático refleja la importancia del papel de estos factores en la biología molecular de los carcinomas prostáticos. Del mismo modo algunos autores encontraron una expresión significativamente mayor de MMP-1, 2 y 9 en muestras de carcinoma prostático que en tejido benigno (Zhong et al 2008)

Igualmente es destacable el hallazgo de una expresión intermedia de MMPs y TIMPs en las muestras de PIN, lo cual parece indicar que la expresión de MMPS y TIMPS en muestras de patología benigna podría identificar lesiones premalignas con riesgo de desarrollar cáncer de próstata.

Encontramos una expresión significativamente más elevada de MMPs y TIMPs en las muestras de carcinoma prostático que en las de patología benigna (PIN o HBP). Sin embargo, no se encontró una diferencia significativa en cuanto a la expresión de la MMP-7 en ningún tipo de lesión prostática, maligna o benigna.

Todo ello parece indicar que las expresiones elevadas de MMPs y TIMPs podrían identificar lesiones prostáticas benignas con riesgo de desarrollar cáncer o incluso asociadas a lesiones malignas indetectables. Por lo cual, estos hallazgos podrían ser de importancia con respecto al diseño de estrategias de prevención del cáncer de próstata basados en inhibición de enzimas del sistema MMP/TIMP.

EXPRESIÓN GLOBAL DE LAS MMPS Y SUS INHIBIDORES EN CARCINOMAS PROSTÁTICOS

Nuestros datos apoyan la heterogeneidad biológica del cáncer de próstata con respecto a la expresión de factores implicados en los procesos de invasión tumoral y el desarrollo de metástasis. Distintos estudios apoyan el hecho de que tanto las células tumorales como las células del estroma (fibroblastos, células epiteliales, células vasculares o células inflamatorias) presentan una expresión aumentada de MMPs y TIMPs, siendo enzimas implicadas en distintas fases de la progresión tumoral, en un porcentaje significativo de los casos de cáncer de próstata. Para que las células tumorales prostáticas invadan la matriz extracelular es necesaria la presencia de proteasas que degraden la membrana basal de los vasos sanguíneos y linfáticos, previamente al desarrollo de metástasis ganglionares o viscerales, por lo que es lógico pensar que la expresión de MMPs y TIMPs se encuentre aumentada en los distintos tipos celulares tumorales y células del estroma peritumoral (John A et al. The role of matrix metalloproteinases in tumour angiogenesis and tumour metastasis. *Pathol Oncol Res.* 2001;7(1): 14-23) (Vizoso FJ et al. *BJC* 2007) (Escaff S et al. *World J Urol* 2011)

En nuestro estudio encontramos una expresión aumentada de todas las MMPs y TIMPS estudiadas en las células tumorales, siendo las que obtuvieron una mayor puntuación MMP-1, MMP-11 y TIMP-2.

Un reciente estudio ha relacionado una producción significativamente mayor de MMP-11 en las muestras de tumores de próstata avanzados o en fases de mayor agresividad tumoral, que en tumores no metastásicos o en fases de sensibilidad a la privación androgénica (Fernández Gómez JM et al. Actas Urolo Esp 2017)

La variabilidad en la expresión global de MMPS y TIMPs que se muestra en este estudio podría estar relacionada con la diversa evolución clínica de los tumores de próstata, proporcionando información pronóstica. Además, estos resultados pueden contribuir a desarrollar nuevas dianas terapéuticas en el cáncer de próstata basadas en la inhibición selectiva de las MMPs Vizoso FJ et al. BJC 2007) (Escaff S et al. World J Urol 2011)

RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GLOBAL DE LAS MMPS Y TIMPS EN CÉLULAS TUMORALES Y CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS EN CANCER DE PRÓSTATA

La diversa evolución clínica del cáncer de próstata podría depender de su expresión de MMPs y TIMPs, al estar estos factores implicados en procesos básicos de progresión tumoral, tales como la degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular, la estimulación de la proliferación celular, motilidad celular, resistencia a la apoptosis y en la angiogénesis (Nagase et al. Cardiovasc Res 2006)(Page-McCaw et al. Nat Rev Mol Cell Biol 2007)

En el presente trabajo se evaluó la posible relación entre la expresión de MMPs y TIMPs y los factores clínico-patológicos de los carcinomas prostáticos (edad, estadio tumoral, grado histológico y niveles de PSA pretratamiento). Nuestros resultados indican asociación entre la expresión de TIMP-1 y el grado histológico. Las muestras que presentaron puntuaciones más elevadas para TIMP-1 tuvieron un grado de Gleason más alto. Esto sugiere la asociación de TIMP-1 con un comportamiento más agresivo del cáncer de próstata.

Dado que las TIMPs inhiben las MMPs 'in vivo' cabría esperar que los niveles elevados de estos inhibidores podrían preveer la progresión tumoral y, por lo tanto, estar relacionadas con una baja agresividad tumoral. Sin embargo, las TIMPs son proteínas multifuncionales que, además de su efecto inhibidor de las MMPs, también muestran distintas funciones estimuladoras de la carcinogénesis, como la implicación en la inducción a la proliferación y la inhibición de la apoptosis (Jiang et al. 2002) (Wurtz et al 2005)

RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE MMPS Y TIMPS EN CELULAS TUMORALES Y LA RECIDIVA BIOQUÍMICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA LOCALIZADO

En nuestro estudio se investigó la posible relación entre la expresión de cada MMP y TIMP y la posibilidad de recidiva a lo largo del seguimiento, expresada por la elevación del PSA después de la cirugía radical de próstata superior a 0.2ng/ml. Los resultados demostraron que la expresión global de MMP-11 y MMP-13 en el cáncer de próstata correlaciona con mayor incidencia de recaída bioquímica. La expresión global de MMP-11 y MMP-13 por las células tumorales puede, en combinación con otros factores, aportar información pronóstica útil tanto para un seguimiento más óptimo como para dirigir un tratamiento más adecuado.

Estos datos nos llevan a pensar que las MMP 11 y 13 podrían ser dianas terapéuticas óptimas para la inhibición del carcinoma de próstata. Nuestro resultado es acorde a estudios previos que asocian la expresión de MMP-11 y 13 con peor pronóstico en otros tumores, tales como el cáncer de mama. (Vizoso FJ et al 2007)(Gonzalez et al 2007)

Para la MMP-13 (colagenasa 3) ha sido encontrada una amplia gama de sustratos específicos cuando se compara con otras MMP. Además, se cree que posee un papel central en la activación de la cascada de MMP tanto activando como siendo activada por otras MMP, como la MMP-14,

MMP-2 y MMP-3 (Freije et al 1994)(Knauper et al 1997). La MMP-13 ha sido detectada en distintas líneas celulares de cáncer de próstata y tejido prostático benigno (Varani et al 2001)(DeClerck et 2004). Su patrón de expresión por células prostáticas parece variar de acuerdo a la malignidad de las células prostáticas, por lo que ha sido sugerida como posible marcador diagnóstico del cáncer de próstata (Morgia et al 2005). Estudios actuales han demostrado que concentraciones más elevadas de MMP-13 en pacientes con metástasis secundarias al cáncer de próstata, así como un marcado descenso en la expresión después del inicio de tratamiento (Morgia ete al)

La MMP-11 (estromalisina-3) se expresa sobretodo en células del estroma peritumoral (Basset et al 1990, 1997). Elevados niveles de MMP-11 se asocian a progresión tumoral y peor pronóstico en cáncer de mama (Chenard et 1996). El gen que codifica la MMP-11 tiene una expresión aumentada en la fase inflamatoria de la cicatrización lo que sugiere que su expresión está mediada por factores producidos por las células inflamatorias en procesos benignos de cicatrización. De modo que la MMP-11 podría ser una factor derivado del estroma necesario para la progresión de algunos tumores epiteliales malignos (Basset et al. 1993).

Por otro lado, nuestros datos muestran que la expresión de MMP-2 por células tumorales se asoció con menor probabilidad de recidiva bioquímica en pacientes con cáncer de próstata, es decir, se asoció a mejor pronóstico del carcinoma. La MMP-2 (Gelatinasa A), al igual que la MMP-9 (Gelatinasa B) se relacionan con la invasión tumoral y las metástasis dada su capacidad para degradar el colágeno tipo IV presente

en la membrana basal (Jones JL et al 1997) y para inducir la angiogénesis (Egeblad M et al 2002). La expresión de ambas MMP se ha asociado a mal pronóstico en algunos carcinomas. Sin embargo la distinta significación pronóstica en el cáncer de próstata es nueva para nosotros, y no tenemos una explicación razonable para esta asociación inversa. En el cáncder de mama se ha descrito que la expresión de MMP-2 está aumentada en las fases más tempranas de la enfermedad, mikentras que la activación de MMP-9 ocurre en fases mas tardías (Liotta LA et al 2001), hallazgo que podría explicar el impacto diferente en el pronóstico del cáncer de próstata localizado.

IDENTIFICACION DE FENOTIPOS EN LA EXPRESIÓN DE MMPs Y TIMPs EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Nuestros datos revelan que es posible identificar dos fenotipos de expresión por parte de las células tumorales de MMPs/TIMPs en cáncer de próstata. Uno de estos grupos, designado como Grupo 1 tiene un perfil de alta expresión de MMPs/TIMPs (n=70) y el designado como Grupo 2 (n=63) presenta un perfil de baja expresión.

Igualmente, encontramos una relación significativa entre estos dos grupos fenotípicos y la recidiva durante el seguimiento. El perfil de alta expresión de MMPs/TIMPs por células tumorales presentó una supervivencia libre de recidiva menor al compararse con el grupo de baja expresión.

Estos hallagos resultan interesantes por las posibles aplicaciones en el desarrollo de futuras terapias basadas en la inhibición del sistema MMP/TIMP.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La expresión de MMPS y TIMPS en las células tumorales fue globalmente más alta en los carcinomas de próstata que en los tejidos de la próstata benigna.
- Se evidenció una variabilidad en la expresión de MMP/TIMP por las células tumorales en los carcinomas de próstata, lo cual apoya la heterogeneidad biológica del cáncer de próstata.
- En las células tumorales, TIMP-1 se asoció significativamente y directamente con el grado tumoral.
- Se objetivó una relación directa entre la expresión de MMP-11 y MMP-13, e inversa de MMP-2, con la recidiva bioquímica tras la prostatectomía radical.
- Pudimos identificar dos grupos bien definidos de expresión de MMPS y TIMPS en las células tumorales con un patrón evolutivo específico.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1-Hamilton WJ, Boyd JD, Mossman HW. Embriología humana. Desarrollo prenatal de la forma y la función. 4ª ed. Buenos Aires: Interamericana; 1973.p. 389-450

2- Mirapeix RM, Sañudo JR. Embriología e histogénesis de la vejiga urinaria. Rev. Urol. 2003; 4(1): 11-17.

3-Cunha CR, Hayward SW, Dahiya R, Foster BA: Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. A1996; 155: 63-72.

4-Thomson AA: Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. Reproduction 2001; 121: 187-195.

5-Lowsley. OS. Development of the human prostate gland with reference to the development of other structures at the neck of the urinary bladder. Am J. Anat 1912; 13: 299-349.

6-Glennister TW. The development of the utricle and of the so-called "middle" or "median" lobe of the human prostate. J. Anat 1962; 96:443-455.

7-Economides KD, Capecchi MR. Hoxb13 is required for normal differentiation and secretory function of the ventral prostate. Development 2003; 130:2061-2069

8-Xia T, Blackburn WR, Gardner WA. Fetal prostate growth and development. Pediatric pathology 1990;10: 527-537.

9-July LV, Akbari M, Zellweger T, et al. Clusterin expression is significantly enhanced in prostate cancer cells following androgen withdrawal therapy. Prostate 2000; 50: 179-188.

10-Cunha GR, Young P. Inability of Tfm (Testicular feminization) epithelial cells to express androgen-dependent seminal vesicle secretory proteins in chimeric tissue recombinants. *Endocrinology* 1991; 128: 3293-3298

11-Lawson RK. Perspectiva histórica de las enfermedades prostáticas. En: *Enfermedades de la próstata*. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 1993. p. 37.

12-Legueu F. *Tratado médico-quirúrgico de las vías urinarias*. Barcelona; Salvat Editores: 1927.

13- Moore RA. Benign hypertrophy of the prostate. A morphologic study. *J.Urol* 1943; 50: 680-710.

14-Franks LM. Benign nodular hyperplasia of the prostate: a review. *Ann R Coll Surg Engl* 1954; 14: 92-106.

15-Mc Neal JE. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* 1988; 12: 619-633.

16-Mc Neal JE. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol* 1978; 15: 340-345.

17-Barry MJ. Epidemiology and natural history of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am* 1990a; 17: 495-507.

18- Girman CJ, Jacobsen SJ, Guess HA et al.: Natural history of prostatism; relationship among symptoms, prostate volume and peak urinary flow rate. *J.Urol* 1995; 153: 1510-1515.

19-Chute CG, Panser La, Girman CJ et al.: The prevalence of prostatism: a population-based survey of urinary symptoms. *J.Urol* 1993; 150: 85-90.

20- Moreno Sierra J, Fernández Pérez C. Caracterización clínica y epidemiológica de los síntomas del tracto urinario inferior relacionados con la hiperplasia benigna de la próstata en la comunidad de Madrid.

21-Salinas AS, Hernández IR, Segura M, Lorenzo JG, López Torres J, Virseda JA. Impacto de los síntomas de prostatismo en pacientes con hiperplasia benigna de próstata. Arch Esp Urol 2000; 53: 212-224.

22-Girman CJ, Jacobsen SJ, Tsukamoto T et al.: Health-related quality of life associated with lower urinary tract symptoms in four countries. Urology 1998; 51: 428-436.

23-Roehrbom CG, Gimman CI, Rhodes T et al.: The relationship between total and free PSA, prostate volume and age in men age 40-60 with no clinical diagnosis of benign prostatic hyperplasia necessitating therapy. J.Urol 2000b; 163 (Suppl):252A.

24-Overland G, Vatten L, Rhodes T et al.: Lower urinary tract symptoms, prostate volume and uroflow in Norwegian community men: Eur Urol 2001; 39: 36-41.

25-Chicharro- Molero JA, Burgos-Rodriguez R, Sánchez-Cruz JJ et al.: Prevalence of benign prostatic hyperplasia in Spanish men 40 years old or older. J Urol 1998; 159: 878-882.

26-Girman CJ, Panser LA, Chute CG, et al. Natural history of prostatism: Urinary flow rates in a community-based study. J Urol 1993; 150:887-892.

27-Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. Nat rev Cancer. 2003:895-902.

28-Maitland NJ, Collins A. A tumor stem cell hypothesis for the origins of prostate cancer. BJU International. 2005; 96: 1219-23.

29-Gonzalbo ML, Isaacs WB. Molecular pathways to prostate cancer. J. Urol. 2003; 170: 2444-52.

30-De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, et al. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostate cancer incidence in screened men. Urology. 2005; 65: 745-9.

31-Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders, et al. Cadherin switching in human prostate cancer progression. Cancer Res. 2000; 60: 3650-4.

32-Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, et al. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005; 29: 1228-42.

33-Sebo TJ, Bock TJ, Cheville JC, et al. The percent of cores positive for cancer in prostate needle biopsy specimens is strongly predictive of tumor stage and volume at radical prostatectomy. *J Urol*. 2000; 163: 174-8.

34-Epstein JI, Partin AW, Sauvageot J, Walsh PC. Prediction of progression following radical prostatectomy. A multivariate analysis of 721 men with long-term follow-up. *AM J Surg Pathol*. 1996; 20: 286-92.

35-Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C. TNM Classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 7th Ed. Wiley-Blackwell 2009: 243-248

36-Donohue RE, Mani JH, Whitesel JA. Pelvic lymph node dissection. Guide to patient management in clinically located confined adenocarcinoma of prostate. *Urology*. 1982; 20: 559-65.

37-Theiss M, Wirth MP, Manseck A, Frohmuller HG. Prognostic significance of capsular invasion and capsular penetration in patients with clinically localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *Prostate*. 1995; 27: 13-7.

38- Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int* 2002 Jul;90(2):162-73.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12081758>

39- Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe 2004. *Ann Oncol* 2005 Mar;16(3):481-8.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15718248>

40- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin 2008 Mar;58(2):71-96.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287387>

41- <http://WWW-dep.iarc.fr/eucan/eucan.htm>

42- Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000: the global picture. Eur J Cancer 2001 Oct;37(Suppl 8):S4-66.

43- Cancer incidence in Sweden 2004. The National Board of Health and Welfare: Stockholm.

http://sjp.sagepub.com/cgi/reprint/34/67_suppl/3.pdf Update

44- Berenguer A, Luján M, Páez A, Santonja C, Ñpascual T. Spanish contribution to the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC). BJU Int. 2003; 92: 33-8.

45- Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. Prostate 1990;17(4):337-47.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2251225>

46-Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1992 Apr;89(8):3367-71.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1565627>

47- Kolonel LN, Altshuler D, Henderson BE. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. Nat Rev Cancer 2004 Jul;4(7):519-27.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15229477>

48- Schmid H-P, Engeler DS, Pummer K, Schmitz-Drager B J. Prevention of prostate cancer: more questions than data. *Cancer Prevention. Recent Results Cancer Res* 2007;174:101-7.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17302190>

49- Kantoff P, Giovannucci E, Brown M. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and its relationship to prostate cancer. *Biochim biophys Acta* 1998; 1378:C1.

50- McNeal JE. Morphogenesis of prostatic carcinoma. *Cancer*. 1965;18: 1659-66.

51- Steinberg GD., Carter B., Beaty T., Chikds B., Walsh P. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate*. 1990; 17: 337-47.

52- Carter RF. BCRA-1, BCRA-2 and breast cancer: a concise clinical review. *Clin Invest Med*. 2001; 24: 147-57.

53- Ablin RJ., Bronson P., Soanes WA., et al: Tissue- and species-specific antigens of normal human prostatic tissue. *J. Immunol.*; 104: 1329, 1970.

54- Wang MC., Valenzuela LA., Murphy GP., et al: Purification of a human prostate specific antigen. *Invest. Urol.*; 17:159, 1979.

55- Lundwall A., Lilja H.: Molecular cloning of human prostatic specific antigen cDNA. *FEBS Lett* 214:317, 1987.

56- Belanger A., van Halbeek H., Graves HCB., et al: Molecular mass and carbohydrate structure of prostate specific antigen: studies for establishment of an international PSA standard. *Prostate*. 27:187, 1995.

57- Wang MC., Papsidero LC., Kuriyama M., et al: Prostate antigen: a new potential marker for prostatic cancer. *Prostate*. 2:89, 1981.

58- Armbruster DA.: Prostate-specific antigen: Biochemistry, analytical methods, and clinical application. Clin. Chem. 39:181; 1993.

59- Riegman PHJ., Vlietstra RJ., Suurmeijer L., et al: Characterization of the human Kallikrein locus. Genomics. 14:6, 1992.

60- Bjork T., Bjartell A., Abrahamsson P-A, et al: Alpha 1-antichymotrypsin production in PSA- producing cells is common in prostate cancer but rare in benign prostatic hyperplasia. Urology 43:247, 1994.

61- Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA Jr. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. N Engl J Med 2004 May 27;350(22):2239-46. (level of evidence: 2a)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15163773>

62- Stenman UH., Leinonen J., H., et al: A complex between prostate-specific antigen and alpha-1- antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. Cancer Res 51:222, 1991

63- Lilja H., Christensson A., Dahlén U., et al.: Prostate-specific antigen in human serum occurs predominantly in complex with alpha-1-antichymotrypsin. Clin.Chem 37:1618,1991.

64- Luderer AA., Chen Y-T., Soriano TF., et al.: Measurement of the proportion of free to total prostatic-specific antigen improves diagnostic performance of prostatic-specific antigen in the diagnostic gray zone of total prostate-specific antigen. Urology 46:187,1995.

65- Catalona WJ., Smiths DS., Ratliff TL., et al.: Measurement of prostatic-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. N. England J. Med. 324:1156, 1991.

66- Labrie F., Dupont A., Suburu R., et al.: Serum prostate-specific antigen as prescreening test for prostate cancer. J. Urol. 147:846, 1992.

67- Catalona WJ., Smith DS., Ratliff TL., et al: Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen based screening. JAMA 270:948, 1993.

68-Cooner WH., Mosley BR., Rutherford Jr CL., et al.: Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. J. Urol 143:1146,1990.

69-Brawer MK., Lange PH.: Prostate-specific antigen: its role in early detection, staging, and monitoring patients with prostatic carcinoma. J. Endourol 3:227, 1989.

70-Catalona WJ, Richie JP., Ahmann FR., et al.: Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: Results of a multicenter clinical trial of 6,6630 men. J. Urol 151:1283, 1994.

71- Gann PJ., Hennekens CH., Stampfer MJ.: A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostatic cancer. JAMA 273:289,1992.

72- Carlos G. Arcangeli, David K. Ornstein, David W. Keetch, Gerald L. Adriole. El antígeno prostático específico como prueba de detección selectiva del cáncer de próstata: La experiencia de Estados Unidos. Clin. Urol. de Norteamérica, 335:345, Vol.2,1997.

73- Seaman E., Whang M., Olsson CA., et al.: PSA density (PSAD): Role in patient evaluation and management. Urol. Clin. North Am. 20:653, 1993.

74- Stamey TA., Yang N., Hay AR., et al.: Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. N. Engl J Med. 317:909, 1987.

75- Carter B., Pearson JD., Metter J., et al.: Longitudinal evaluation of prostate-specific antigens levels in men with and without prostate diseases. JAMA, 1992; 267:2215-20.

76- Oesterling Je., Jacobsen SJ., Chute CG., et al.: Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men: establishment of age-specific reference ranges. JAMA. 1993; 270:860-4.

- 77- Christensson A., Björk T., Nilsson O., Dahlén U, et al.: Serum prostate specific antigen complexed to alpha-1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J.Urol.* 1993; 150:100-5.
- 78- Bostwick D.G., Grignon D.J., Hammond E.H.: Prognosis factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 124: 995-1000; 2000.
- 79- Sobin LH., Fleming LD.: TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 1997; 80: 1803-1804.
- 80- Nelson JB., Lepor H.: Prostate Cancer: radical prostatectomy. *Urol. Clin. North. Am.* 2003; 30: 703-723.
- 81- Oesterling JE., Fuks Z., Lee CT., Scher HI.: Cancer: Cancer of the prostate. En: De Vita VT., Hellman S., Rosemberg SA.(eds): *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 5ª ed. Filadelfia: Lippincot-Raven, 1997; 1322-1385.
- 82- Eisemberger MA., Crawford ED., Wolf M., et al.: Prognostic factors in stage D2 prostate cancer: important implications for future trials. Results from a cooperative intergroup study (INT 0036). *Semin. Oncol.* 1994; 21: 613.
- 83- Gleason DF.: Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In.: Tannenbaum M., ed. *Urologic pathology: The prostate*. Philadelphia, PA.: Lee and Febiger 1977: 171-198.
- 84- Chan TY., Partin AW., Walsh PC., Epstein JI.: Prognostic significance of Gleason score 3+4 versus Gleason score 4+3 tumor at radical prostatectomy. *Urology* 2000; 56: 823-827.
- 85- Zincke et al., 1994????
- 86- Ohori M., Wheeler TM., Kattan MW., Goto Y., Scardino PT.: Prognostic significance of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens. *J. Urol* 1995; 154: 1818-1824.

87- Babaian RJ., Troncoso P., Steelhammer LC.: Tumor volume and prostate specific antigen: implications for early detection and defining a window of curability. J. Urol. 1995; 154: 1808-1812.

88-Bluestein DL., Bostwick DG., Bergstrahl EJ., Oesterling JE.: Eliminating the need for bilateral pelvic lymphadenectomy in select patients with prostate cancer. J. Urol. 1994; 151: 1315-1320.

89-Parra RO., Isorna S., Perez MG., Cummings JM., Boullier JA.: Radical perineal prostatectomy without pelvic lymphadenectomy: selection criteria and early results. J. Urol. 1996; 152: 612-615.

90-Partin AW., Pound CR., Clemens JQ., Epstein JI., Walsh PC.: Serum PSA after anatomic radical prostatectomy. The John Hopkins experience after 10 years. Urol. Clin. North. Am. 1993; 20: 713-725.

91-Catalona WJ., Smith DS.: 5-year tumor recurrence rates after anatomical radical retropubic prostatectomy for prostate cancer. J. Urol. 1994; 152: 1837-1842.

92- Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery—what we have learned and where we are going. J Urol 1999 Aug;162(2):293-306.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411025>

93- Moul JW. Prostate specific antigen only progression of prostate cancer. J Urol 2000 Jun;163(6): 1632-42.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10799151>

94- American Society for Therapeutic Radiology and Oncology Consensus Panel. Consensus statement: guidelines for PSA following radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997 Mar;37(5):1035-41.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9169810>

95- Roach M 3rd, Hanks G, Thames H Jr, Schellhammer P, Shipley WU, Sokol GH, Sandler H. Defining biochemical failure following radiotherapy with or without

hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int J Radiat Biol Phys* 65:965-74.

<http://www.mdconsult.com/das/citation/body/1206748702/jorg=journal&source=MI&sp=16362265&sid=0/N/16362265/1.html>

96- Babaian RJ., Troncoso P., Steelhammer LC.: Tumor volume and prostate specific antigen: implications for early detection and defining a window of curability. *J. Urol.* 1995; 154: 1808-1812.

97- Stamey TA, Yemoto CM, McNeal JE, Sigal BM, Johnstone IM. Prostate cancer is highly predictable: a prognostic equation based on all morphological variables in radical prostatectomy specimens. *J Urol* 2000 Apr;163(4):1155-60.

98- Partin AW., Pound CR., Clemens JQ., Epstein JI., Wlasko JC.: Serum PSA after anatomic radical prostatectomy. The John Hopkins experience after 10 years. *Urol. Clin. North. Am.* 1993; 20: 713-725.

99- McNeal JE., Villers AA., Redwine EA., Freiha FS., Stamey TA.: Capsular penetration in prostate cancer: significance for natural history and treatment. *Am. J.Surg. Pathol.* 1990; 14: 240-244.

100- Villers A., McNeal JE., Redwine EA. Et al.: The role of perineural space invasion in the local spread of prostatic adenocarcinoma. *J. Urol.* 1989; 142: 763-768.

101- Huss WJ., Gregory CW., Smith GJ.: Neuroendocrine cell differentiation in the CWR22 human prostate cancer xenograft: Association with tumor cell proliferation prior to recurrence. *Prostate* 2004; 60: 91-97.

102- Veltri RW., Partin AW., Epstein JE., Marley GM., Miller CM., Singer DS et al.: Quantitative nuclear morphometry, markovian texture descriptors and DNA content captured on a CAS-200 image analysis system, combined with PCNA and HER-2/neu immunohistochemistry for prediction of prostate cancer progression. *J. Cell Biochem.* 1994; sup. 19: 249-258.

103- Lieber MM.: Practical clinical utility of DNA ploidy for managing patients with prostate carcinoma. *Urology* 1995; 45: 558-562.

- 104- Moul JW., Bettencourt MC., Sesterhenn IA., Mostofi FK., McLeod DG., Srivastava S., Bauer JJ.: 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: 159-166.
- 105- Elo JP., Visakorpi T.: Molecular genetics of prostate cancer. *Ann. Med.* 2001; 33: 130-41.
- 106- DeMarzo AM., Nelson WG., Isaacs WB., Epstein JL.: Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet* 2003; 361: 955-964.
- 107- Lipponem P., Vesalainen S.: Expression of the apoptosis suppressing protein bcl-2 in prostatic adenocarcinoma is related to tumor malignancy. *Prostate* 1997; 32: 9-16.
- 108- Haldar S, Basu A, Croce CM. Bcl-2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res* 1997 Jan;57(2):229-33,
- 109- Stapleton AM, Timme TL, Gousse AE, Li QF, Tobon AA, Kattan MW, Slawin KM, Wheeler TM, Scardino PT, Thompson TC. Primary human prostate cancer cells harboring p53 mutations are clonally expanded in metastases. *Clin Cancer Res* 1997 Aug;3(8):1389-97,
- 110- Peehl DM., Wehner N., Stamey TA.: Activated Ki-ras oncogene in human prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 1987; 10: 281-289.
- 111- Augustin H., Hammerer PG., Graefen M., Palisaar J., Daghofer F., Huland H., Erbersdobler A.: Characterisation of biomolecular profiles in primary high-grade prostate cancer treated by radical prostatectomy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2003; 129: 662-668.
- 112- 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 Oct;156(4):1511-6,
- 113- MacGrogan D, Bookstein R. Tumour suppressor genes in prostate cancer. *Semin Cancer Biol* 1997 Feb;8(1):11-9

- 114- -Elo JP., Visakorpi T.: Molecular genetics of prostate cancer. *Ann. Med.* 2001; 33; 130-41.
- 115- Ibrahim GK., Kerns BJM., McDonald JA., Ibrahim SN., Kinney RB., Humphrey PA., Robertson CN.: Differential immunoreactivity of epidermal growth factor receptor in benign dysplastic and malignant prostatic tissues. *J. Urol.* 1993; 149; 170-73.
- 116-Wilding G., Valverius E., Knabbe C., Gelmann EP.: Role of the transforming growth factor-alpha in human prostate. *Cancer cell growth. Prostate* 1989; 15: 1-12.
- 117- Cardillo MR., Monti S., Di Silverio F., Gentile V., Sciarra F., Toscazo V.: Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II and IGF type I receptor (IGFR-I) expression in prostatic cancer. *Anticancer Res.* 2003; 23; 3825-3835.
- 118- Steiner MS., Barrack ER.: Transforming growth factor-beta 1 overproduction in prostate cancer: effects on growth in vivo and in vitro. *Mol. Endocrinol.* 1992; 6; 15-25.
- 119- Liotta LA., Rao CN., Wewer UM.: Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Ann. Rev. Biochem.* 1986; 55; 1037-1057.
- 120- -Kallakury BV., Sheehan CE., Winn-Deen E., Oliver J., Fisher HA., Kaufman RP Jr., Ross JS.: Decreased expression of catenins (alpha and beta), p120 CTN, and E-cadherin cell adhesion proteins and E-cadherin gene promoter methylation in prostatic adenocarcinomas. *Cancer* 2001; 92; 2786-2795.
- 121- Cress AE., Rabinovitz I., Zhu W., Tagle RB.: The alpha-6 β 1 and alpha-6 β 4 integrins in human prostate cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 1995; 14; 219-228.
- 122- Liotta LA., Steeg PS., Stetler-Stevenson WG.: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-336.
- 123- Helenius MA., Saramaki OR., Linja MJ., Tammela TL., Visakorpi T.: Amplification of urokinase gene in prostate cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 5340-5344.
- 124- Sinha AA., Wilson MJ., Gleason DF., Reddy PK., Sameni M., Sloane BF.: Immunohistochemical localization of cathepsin D in neoplastic human prostate. *Prostate* 1995; 26: 171-178.

- 125- Vizoso F., Sánchez LM., Díez-Itza I., Merino P., López-Otín C.: Pepsinogen C is a new prognostic marker in primary breast cancer. *J. Clin. Oncol* 1995; 13: 54-61.
- 126- Merino AM. Análisis de la expresión del pepsinógeno C y su regulación hormonal en carcinomas humanos. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo. 1998.
- 127- Liotta LA., Stetler-Stevenson WG.: Metalloproteinases and cancer invasion. *Semin Cancer Biol* 1990; 1: 99-106.
- 128- Wood M., Funge K., Moler JL. Et al.: In situ hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TMPI-1 y TMPI-2 expression in human prostate cancer. *Clin Exp Metast* 1997; 15: 246-258.
- 129- Fang J., Shing Y., Wiederschain D., et al.: Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc Natl. Acad Sci USA*. 2000; 97: 3884.
- 130- Sehgal G., Hua J., Bernhard EJ., et al.: Requirement for matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) expression in metastasis by murine prostate carcinoma. *Am J. Pathol* 1998; 152-591.
- 131- Upadhyay J., Shekarriz B., Nemeth JA., et al.: Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-2 immunolocalization in human prostate: Change in cellular localization associated with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Clin. Cancer Res*. 1999; 5: 4105.
- 132- Sloane BF, Yan S, Podgorski I, et al. Cathepsin B and tumor proteolysis: contribution of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol* 2005;15:149.
- 133-West RB, Nuyten DS, Subramanian S, et al. Determination of stromal signatures in breast carcinoma. *PLoS Biol* 2005;3:e187.
- 134 -Bacac M, Provero P, Mayran N, Stehle JC, Fusco C and Stamenkovic I. A mouse stromal response to tumor invasion predicts prostate and breast cancer patient survival. *PLoS ONE* 2006;1:e32.

135-Patocs A, Zhang L, Xu Y, et al. Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. *N Engl J Med* 2007;357:2543.

136-Fukino K, Shen L, Patocs A, Mutter GL and Eng C. Genomic instability within tumor stroma and clinicopathological characteristics of sporadic primary invasive breast carcinoma. *Jama* 2007;297:2103.

137-Bergamaschi A, Tagliabue E, Sorlie T, et al. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol* 2008;214:357

138-Beck AH, Espinosa I, Gilks CB, van de Rijn M and West RB. The fibromatosis signature defines a robust stromal response in breast carcinoma. *Lab Invest.* 2008;88:591.

139- Vizoso FJ, González LO, Corte MD et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer *British Journal of Cancer* 2007, 96:903-11.

140- González LO, Pidal I., Junquera S., Corte MD, Vázquez J, Rodríguez J.C, Lamelas ML, Merino A.M., García-Muñiz JL, Vizoso F. Overexpression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in mononuclear inflammatory cells in breast cancer correlates with metastasis-relapse. *British Journal of Cancer* 2007, 97: 957-63.

141- González LO, M.D. Corte, J. Vázquez, S. Junquera, R. Sánchez, Rodríguez JC, Lamelas ML, Vizoso F. Study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in ductal in situ carcinomas of the breast. *Histopathology* 2008; 53: 403-415.

142-[Escaff S](#), [Fernández JM](#), [González LO](#), [Suárez A](#), [González-Reyes S](#), [González JM](#), [Vizoso FJ](#). [World J Urol](#). 2011 Oct;29(5):657-63. Epub 2010 Oct 1. Collagenase-3 expression by tumor cells and gelatinase B expression by stromal fibroblast-like cells are associated with biochemical recurrence after radical prostatectomy in patients with prostate cancer.

143- Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 415-433.

144- Meller D, Li DQ, Tseng SC. Regulation of collagenase, stromelysin, and gelatinase B in human conjunctival and conjunctivochalasis fibroblasts by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2922-2929.

145- Turk V, Kos J, Turk B. Cysteine cathepsins (proteases)--on the main stage of cancer? *Cancer Cell* 2004; 5: 409-410.

146-Rifkin DB, Mazzieri R, Munger JS, Noguera I, Sung J. Proteolytic control of growth factor availability. *Apmis* 1999; 107: 80-85.

147-Manes S, Llorente M, Lacalle RA *et al*. The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 6935-6945.

148-Noe V, Fingleton B, Jacobs K *et al*. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 2001; 114: 111-118

149- Fingleton B, Vargo-Gogola T, Crawford HC, Matrisian LM. Matrilysin [MMP-7] expression selects for cells with reduced sensitivity to apoptosis. *Neoplasia* 2001; 3: 459-468

- 150-Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 1999; 103: 1237-1241.
- 151-Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* 1997; 88: 801-810.
- 152-Cornelius LA, Nehring LC, Harding E *et al.* Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol* 1998; 161: 6845-6852.
- 153-Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaisse J. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett* 2000; 486: 247-251
- 154-Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 2002; 21: 2245-2252.
- 155-Wurtz SO, Schrohl AS, Sorensen NM *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 215-227.
- 156-Dennis LK, Lynch CF, Torner JC. Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology* 2002; 60: 78-83.
- 157-Bratland A, Ragnhildstveit E, Bjornland K *et al.* The metalloproteinase inhibitor TIMP-2 is down-regulated by androgens in LNCaP prostate carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 541-547.

158-Daja MM, Niu X, Zhao Z, Brown JM, Russell PJ. Characterization of expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2003; 6: 15-26.

159-Dong Z, Bonfil RD, Chinni S *et al.* Matrix metalloproteinase activity and osteoclasts in experimental prostate cancer bone metastasis tissue. *Am J Pathol* 2005; 166: 1173-1186.

160- Brehmer B, Biesterfeld S, Jakse G. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and their inhibitors (TIMP-1 and -2) in prostate cancer tissue. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2003; 6: 217-222.

161- Morgia G, Falsaperla M, Malaponte G *et al.* Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urol Res* 2005; 33: 44-50.

162-Semaan M, Jovenin N, Birembaut P, Menard J, Staerman F. [Prognostic value of stromal immunolabelling by MMP-2, MT1-MMP and TIMP-2 in clinically localized prostate cancer]. *Prog Urol* 2005; 15: 250-254.

163-Riddick AC, Shukla CJ, Pennington CJ *et al.* Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. *Br J Cancer* 2005; 92: 2171-2180.

164-Cardillo MR, Di Silverio F, Gentile V. Quantitative immunohistochemical and in situ hybridization analysis of metalloproteinases in prostate cancer. *Anticancer Res* 2006; 26: 973-982

165- Li HC, Cao DC, Liu Y *et al.* Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88: 75-85.

166- Nabha SM, Bonfil RD, Yamamoto HA *et al.* Host matrix metalloproteinase-9 contributes to tumor vascularization without affecting tumor growth in a model of prostate cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2006; 23: 335-344.

167- EXPRESIÓN DE METALOPROTEASA DE MATRIZ 9 EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA. EXPERIENCIA PRELIMINAR. Iván González Rodríguez, Manuel Rivas del Fresno, Rodrigo Gil Ugarteburu, Patricia González Arriaga, Felicitas López Cima, Ana Fernández Samoano, Valentín Muruamendaraz Fernández, Isabel Fernández García, Jose Ramón Pérez-Carral y Adonina Tardón. *Arch. Esp. Urol.* 2010; 63 (2): 119-124

168- POLIMORFISMOS DE LA METALOPROTEASA DE MATRIZ 9 (MMP-9) EN EL DIAGNÓSTICO DEL CARCINOMA PROSTÁTICO. EXPERIENCIA PRELIMINAR. Rodrigo Gil Ugarteburu, Manuel Rivas del Fresno, Iván González Rodríguez, Patricia González Arriaga, Felicitas López Cima, Ana Fernandez Samoano, Isabel Fernández García, Priscila Benito García, Valentín Muruamendaraz Fernández y Adonina Tardón. *Arch. Esp. Urol.* 2010; 63 (2): 125-132

169- Hughes C, Murphy A, Martin C, Sheils O, O'Leary J. Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58: 673-684

170- guidelines europeas del año ¿en que se seguían los pacientes??

171- Flemming I, Cooper I, Hemson D (1997) The 1992 TNM Classification. American Joint Committee on Cancer Staging Manual 5Th edn, JB Lippincott: Philadelphia 219-222

172- (ref 83 de esta lista) Gleason DF.: Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In.: Tannenbaum M., ed. *Urologic pathology: The prostate.* Philadelphia, PA.: Lee and Febiger 1977: 171-198.

- 173- Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen Sm Cordon-Cardo C, Guise TA, Massague J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, 2003; 3; 537-549
- 174- Prybylowska K, Kluczna A, Zadrozny M, Krawczyk T, Kulig A, Rykala J, Kolacinska A, MOrawiec Z, Drzewoski J, Blasiak J. Polimorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2006; 95: 65-72
- 175- Jian WG, Davies G, Martin TA, Parr Ch, Watkins G, Mason MD, Mokbel K, Mansel RE. Targeting matrelysin and its impact on tumor growth in vivo: the potential implications in breast cancer therapy. *Clinical cancer res* 2005; 11: 6012-6019.
- 176- Basset P, Bellocq JP, Lefebvre O, Noel A, Chenard MP, Wolf C, Anglard P, Rio MC. Stromelysin-3: a paradigm for stroma-derived factors implicated in carcinoma progression. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1997; 26: 43-53
- 177- Chenard MP, O'Siorain L, Shering S, Rouyeer N, Lutz Y, Wolf C, Basset P, Bellocq JP, Duffy MJ. High levels of stromelysin-3 correlate with poor prognosis in patients with breast carcinoma. *INT J Cancer* 1996; 69: 448-451.
- 178- Knauper V, Lopez-Otín C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996; 271:1544-1550
- 179- Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 1995; 270: 5331-5338
- 180- Schrohl AS, Holten-Andersen MN, Peters HA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Brunner N, Foekens JA. Tumor tissue levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as a prognostic marker in primary breast cancer. *Clin CaNCER Res* 2004; 10: 2289-2298.

181- <http://gco.iarc.fr/>

182- Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years. *J Urol* 1994 Nov; 152 (5 Pt 2): 1831-6

183- Kupelian P, Katcher J, Levin H, Zippe C, Klein E. Correlation of clinical and pathologic factors with rising prostate-specific antigen profiles after radical prostatectomy alone for clinically localized prostate cancer. *Urology* 1996 Aug; 48 (2): 249-60

184- Van de Ouden D, Hop WC, Kranse R, Schröder FH. Tumour control according to pathological variables in patients treated by radical prostatectomy for clinically localized carcinoma of the prostate. *Br J Urol* 1997 Feb; 79(2); 203-11

185- Sanchís-Bonet A, Arribas-Gomez, Sanchez-Rodríguez C, Sanchez-Chapado M. Evolution of the patient characteristics of candidates for radical prostatectomy and the results obtained with the technique. *Actas Urol Esp* 2015 Mar;39(2):78-84

186- Harvey P, Bauita A, Enderlsby D, Curtis B, Lacovidou A, Walker M. A systematic review of the diagnostic accuracy of prostate specific antigen. *BMJ Urol* 2009; 9:14.

187- Vickers AJ¹, Ulmert D, Sjöberg DD, Bennette CJ, Björk T, Gerdtsson A, Manjer J, Nilsson PM, Dahlin A, Bjartell A, Scardino PT, Lilja H.

Strategy for detection of prostate cancer based on relation between prostate specific antigen at age 40-55 and long term risk of metastasis: case-control study. *BMJ*. 2013 Apr 15;346:f2023. doi: 10.1136/bmj.f2023.

188- Andriole GL, Crawford ED, Grubb III RL et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *New Engl J Med* 2009; 360:1310-9

189- Grossfeld GD, Chang JJ, Broering JM, Li YP, Lubeck DP, Flanders SC, Carroll PR. Under staging and under grading in a contemporary series of patients undergoing radical prostatectomy: results from the cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor database. *J Urol* 2001 Mar; 165(3):851-6

- 190- Rodríguez Faba O, Fernandez Gómez JM, Guate Ortíz JL, Martín Benito JL, Pérez García FJ, García Rodríguez J et al. Assessment of the Gleason score in biopsies and specimens of radical prostatectomy. *Arch Esp Urol*. 2003. 56:781-784.
- 191- Algaba Arrea F, Chivite de León A, Santaularia Segura JM, Oliver Samper A. Evidence of the radical prostatectomy Gleason score in the biopsy Gleason score. *Actas Urol Esp*. 2004. 28:21-26.
- 192- Zhong WD, Han ZD, He HC, Bi XC, Dai QS, Zhu G, Ye YK, Liang YX, Qin WJ, Zhan Z, Zeng GH, Chen ZN. CD147, MMP-1, MMP2 and MMP-9 protein expression as significant prognostic factors in human prostate cancer. *Oncology* 2008.75; 230-236.
- 193- John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumour angiogenesis and tumour metastasis. *Pathol Oncol Res*. 2001;7(1): 14-23
- 194- Vizoso FJ, Gonzalez LO, Corte MD, Rodríguez JC, Vázquez J, Lamelas ML, Junquera. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *BJC* 2007; 96; 903-911.
- 195- Escaff S, Fernández JM, González L, Suarez A, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez JM, Vizoso FJ. Collagenase-3 expression by tumor cells and gelatinase B expression by stromal fibroblast-like cells are associated with biochemical recurrence after radical prostatectomy in patients with prostate cancer. *World J Urol* 2011; 29: 657-663
- 196- Fernández Gómez JM et al. *Actas Urol Esp* 2017
- 197- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69:562-73
- 198- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 221-33
- 199- Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 2002; 21: 2245-2252.

- 200- Wurtz SO, Schrohl AS, Sorensen NM, Lademann U, Christensen IJ, Mlouridsen H, Brunner N. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 215-227.
- 201- Vizoso FJ, Gonzalez LO, Corte MD, Rodriguez JC, Vazquez J, Lamelas ML, Junquera S, Merino AM, Garcia-Muñiz JL, Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer* 2007; 96: 902-11
- 202- Gonzalez LO, Pidal I, Junquera S, Corte MD, Vazquez J, Rodriguez JC, Lamelas ML, Merino AM, Garcia-Muñiz JL, Vizoso FJ. Overexpression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in mononuclear inflammatory cells in breast cancer correlates with metastasis-relapse. *Br J Cancer* 2007; 97: 957-63.
- 203- Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, Lopez-Otín C. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 1994; 269: 16766-16773
- 204- Knauper V, Cowell S, Smith B, Lopez-Otín C, O'shea M, Morris H, Zardi L, Murphy G. The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem* 1997; 272: 7608-7616.
- 205- Varani J, Hattori Y, Dame MK, Schmidt T, Murphy HS, Johnson KJ, Wojno KJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in fresh human prostate tumour tissue and organ-cultured prostate tissue: levels of collagenolytic and gelatinolytic MMPs are low, variable and different in fresh tissue versus organ-cultured tissue. *Br J Cancer* 2001; 84: 1076-1083
- 206- DeClerck AY, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, Raz A, Matrisian LM, Sloane BF, Noel A, Hendrix MJ, Coussens L, Padarathsingh M. Proteases extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol* 2004; 164: 1131-1139
- 207- Morgia G, Falsaperla M, Malaponte G, Mdonia M, Indelicato M, Travali S, Mazarino MC. Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urol Res* 2005; 33: 44-50.

- 208- Basset P, Bellocq JP, Lefebvre O, Noel A, Chenard MP, Wolf C, Anglard P, Rio MC. Stromelysin-3: a paradigm for stroma-derived factors implicated in carcinoma progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 1997; 26: 43-53
- 209- Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, POdhajcer OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990; 348: 699-704
- 210- Chenard MP, O`Siorain L, Shering S, Rouyer N, Lutz Y, Wolf C, Basset P, Bellocq JP, Duffy MJ. High levels of stromelysin-3 correlate with poor prognosis in patients with breast carcinoma. *Int J Cancer* 1996; 69:448-451.
- 211- Basset P, Wolf C, Chambon P. Expression of the stromelysin-3 gene in fibroblastic cells of invasive carcinomas of the breast and other human tissues: a review. *Breast Cancer Res Treat.* 1993; 24(3):185-93
- 212- Jones JL, Wlaker RA. Control of matrix metalloproteinase activity in cancer. *J Pathol* 1997; 183(4): 377-9
- 213- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(3):161-74
- 214- Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; 411(6835):375-9

Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in prostate cancer

S Escaff^{1,2}, JM Fernández³, LO González^{2,4}, A Suárez¹, S González-Reyes^{2,4}, JM González² and FJ Vizoso^{*,2,4}

¹Servicio Urología, Hospital de Jove, Gijón, Spain; ²Unidad de Investigación, Hospital de Jove, Gijón, Spain; ³Servicio de Urología, Hospital Universitario Central de Asturias, Spain; ⁴Unidad Multidisciplinario de Investigación en Oncología Quirúrgica del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, Oviedo, Spain

BACKGROUND: Extracellular matrix metalloproteases (MMPs) have raised an extraordinary interest in cancer research because of their potential role in basal membrane and extracellular matrix degradation, consequently facilitating tumour invasion and metastases development.

METHODS: An immunohistochemical study was performed using tissue arrays and specific antibodies against MMPs 1, 2, 7, 9, 11, 13, 14, and their tissue inhibitors, TIMPs 1, 2 and 3. More than 2600 determinations on cancer specimens from 133 patients with clinically localised prostate carcinoma, 20 patients with prostatic intraepithelial neoplasia and 50 patients with benign prostate hyperplasia and controls, were performed.

RESULTS: When compared with benign pathologies, prostate carcinomas had higher expression of all MMPs and TIMPs. Dendrogram shows a first-order division of tumours into two distinct MMPs/TIMPs molecular profiles, one of them with high MMPs/TIMPs expression profile ($n = 70$; 52.6%). Tumours with high expression of MMP-11 or -13, or cluster thereof, were significantly associated with higher probability of biochemical recurrence.

CONCLUSION: The expression of MMPs and TIMPs seems to have an important role in the molecular biology of prostate carcinomas, and their expression by tumours may be of clinical interest to used as indicators of tumour aggressiveness.

British Journal of Cancer (2010) **102**, 922–929. doi:10.1038/sj.bjc.6605569 www.bjcancer.com

Published online 16 February 2010

© 2010 Cancer Research UK

Keywords: prostate carcinoma; tissue arrays; prognosis; MMP; TIMP; PSA

The prevalence of prostate cancer is so high that it could be considered as a normal age-related phenomenon (Hughes *et al*, 2005). Several published autopsy series have shown that up to one-third of men between the ages of 30 and 40 years harbour histological evidence of prostate carcinoma (Sakr *et al*, 1994).

A significant minority of patients undergoing radical prostatectomy for clinical organ-confined disease will ultimately be found to have pathological evidence of spread outside the prostate. Although these patients may be expected to have progression and survival rates comparable to those of patients with clinical advanced clinical disease, as defined by grade and serum prostate-specific antigen (PSA) level, those men who present with clinical stage T3 are likely to have greater tumour volume, higher grade and increased likelihood of regional spread. Currently, the majority of men undergoing prostatectomy for pathologically advanced disease are categorised as high risk on the basis of serum PSA value or biopsy Gleason score. Nevertheless, there is some overlap in the groups of men undergoing radical prostatectomy for

clinical stage T3 and for pathological stage T3 (Meng and Carrol, 2007).

Despite recent improvement in diagnostic and therapeutic techniques, the survival rate of prostate cancer patients remains poor due to post-treatment recurrence disease. Despite all the recent efforts in the identification of molecular mechanisms involved in the progression of prostate cancer, tumour progression in the prostatic compartment, as well as in the metastasis compartment, is poorly understood (Logothetis and Lin, 2005). These pitfalls underscore the need for new risk markers that allow the early detection of carcinogenesis and, therefore, of cancer relapse.

Degradation of the stromal connective tissue and basement membrane components are key elements in tumour invasion and metastasis. This is particularly true with the interstitial collagens, which are very resistant to proteolytic attacks, being degraded only by matrix metalloproteinases (MMPs) (Nelson *et al*, 2000). The human MMP family currently consists of 28 members of homologous zinc-dependent endopeptidases that can be divided into eight structural classes or, on the basis of their substrate specificity and primary structure, into the more familiar subgroups of collagenases (MMP-1, -8 and -13), gelatinases (MMP-2 and -9), stromelysins (MMP-3, -10, -11), membrane-associated MMPs (MMP-14, -15, -16, -17, -23, -24, -25) and other novel MMPs (Brinckerhoff *et al*, 2000; Overall and Lopez-Otin, 2002; Demers *et al*, 2005). The MMPs are synthesised as inactive zymogens,

*Correspondence: Dr FJ Vizoso, Servicio de Cirugía General, Hospital de Jove, Avda. Eduardo Castro s/n, 33920 Gijón, Asturias, Spain;

E-mail: investigacion@hospitaldejove.com

Received 29 October 2009; revised 7 January 2010; accepted 12 January 2010; published online 16 February 2010

which are then predominantly activated pericellularly by either other MMPs or by serine proteases. On the other hand, there are available data clearly challenging the classic dogma stating that MMPs promote metastases exclusively by modulating the remodelling of extracellular matrix. Indeed, MMPs have been identified that are able to affect *in vivo* tumour cell behaviour as a consequence of their ability to cleave growth factors, cell surface receptors, cell adhesion molecules or chemokines/cytoquines (Manes *et al*, 1999; Noe *et al*, 2001; Egeblad and Werb, 2002; Turk *et al*, 2004). Furthermore, by cleaving proapoptotic factors, MMPs are able to produce a more aggressive phenotype through generation of apoptotic resistant cells (Fingleton *et al*, 2001). The MMPs may also regulate cancer/related angiogenesis, both positively through their ability to mobilise or activate proangiogenic factors (Stetler-Stevenson, 1999), and negatively through generation of angiogenesis inhibitors, such as angiostatin and endostatin, which are cleaved from large protein precursors (Cornelius *et al*, 1998). The MMPs' activities are specifically inhibited by the so-called tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Currently, four different TIMPs are known to exist: TIMPs 1, 2, 3 and 4. However, it is now assumed that TIMPs are multifactorial proteins that are also involved in the induction of proliferation and inhibition of apoptosis (Wurtz *et al*, 2005).

The expression in prostate cancer of several MMPs and TIMPs, such as MMP-2, -7, -9, -13 and -14, TIMP-1, -2 and -3, has been recently reported (Brehmer *et al*, 2003; Pang *et al*, 2004; Zhang *et al*, 2004; Morgia *et al*, 2005; Riddick *et al*, 2005; Semaan *et al*, 2005; Cardillo *et al*, 2006). In addition, recent studies have shown that overexpression of MMPs induces prostate tumour growth and increases the development of metastasis (Bratland *et al*, 2003; Daja *et al*, 2003; Cao *et al*, 2005, 2008; Dong *et al*, 2005; Lynch *et al*, 2005; Nabha *et al*, 2006; Bonfil *et al*, 2007; Millimaggi *et al*, 2007; Pulkuri and Rao, 2008). Likewise, an association between MMPs and/or TIMPs expression and parameters indicative of tumour aggressiveness or poor outcome in patients with prostate cancer has also been reported (Gohji *et al*, 1998; Brehmer *et al*, 2003; Trudel *et al*, 2003; Morgia *et al*, 2005; Riddick *et al*, 2005; Semaan *et al*, 2005; Cardillo *et al*, 2006).

The objectives of this study were to evaluate the expression and clinical relevance of several MMPs and TIMPs of previously recognised biological importance in prostate carcinomas, using the tissue array (TA) technique. This technique has allowed us the processing of a large number of tissue specimens for a wide range of protein determinations.

MATERIALS AND METHODS

Patients and tissues samples

The histological material used in this study was obtained from 133 patients with clinical localised prostate carcinoma (age range 44–79 years), from 20 patients with prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) (age range 54–70 years) and from 50 patients with benign prostate hyperplasia (BPH) (age range 54–70 years). We selected patients with prostate adenocarcinomas that had undergone radical retropubic prostatectomy and had a minimum of 5-year follow-up in those cases that did not present a biochemical recurrence. The exclusion criteria were the following: metastatic disease at presentation, previous history of any type of malignant tumour, having received any type of neoadjuvant therapy, development of a second primary cancer and absence of sufficient tissue in the paraffin blocks used for manufacturing TAs. From a total of 158 patients fulfilling these criteria, we selected randomly a sample size of 133 patients, divided in two different groups of similar size and stratified with regard to the development of biochemical recurrence, which was the key variable of the study. Of these patients, 47 presented biochemical recurrence

Table 1 Basal characteristics of 133 patients with prostate carcinoma

Characteristics	Without biochemical recurrence	With biochemical recurrence	P-value
	(n = 86)	(n = 47)	
	No. (%)	No. (%)	
Age (year)			NS
< 65	52 (39.5)	28 (40.4)	
> 65	34 (60.5)	19 (59.6)	
Tumoural stage			<0.0001
T2	79 (91.9)	27 (57.4)	
T3–4	7 (8.1)	20 (42.6)	
Gleason grading			<0.003
2–4	14 (16.3)	4 (8.5)	
5–6	50 (58.1)	17 (36.2)	
7–10	22 (25.6)	26 (55.3)	
PSA (ng ml ⁻¹)			NS
< 10	65 (75.6)	28 (59.6)	
> 10	21 (24.4)	19 (40.4)	

Abbreviations: NS = not significant; PSA = prostate-specific antigen.

(PSA level >0.2 ng ml⁻¹, with a second confirmatory determination). Patients and tumour characteristics are listed in Table 1. Tumours were staged according to the 1992 TNM classification (Flemming *et al*, 1997). Histological tumour grading was established according to the Gleason criteria (Whitmore, 1956). The PSA serum levels were determined, preoperatively and postoperatively, using the 'Elecys' immune-assay tests (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). Determination of PSA serum levels was performed 1 month after surgical treatment, finding undetectable levels in all patients. Finally, all cases were evaluated for disease recurrence or survival status by clinical, radiological and biological examinations every 6 months. The mean follow-up period was 62 months (range: 6–144 months). Patients were treated according to the guidelines used in our institutions. The study adhered to national regulations and was approved by our institution's Ethics and Investigation Committee.

Tissue arrays and immunohistochemistry

All radical retropubic prostatectomy specimens were routinely fixed in 10% neutral-buffered formalin and stored after being embedded in paraffin at room temperature from 4 months to 5 years before further testing was performed. Histopathological representative tumour areas were defined on haematoxylin and eosin-stained sections and marked on the slide. Tumour TA blocks were obtained by punching a tissue cylinder (core) with a diameter of 1.5 mm through a histological representative area of each 'donor' tumour block, which was then inserted into an empty 'recipient' TA paraffin block using a manual tissue arrayer (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA) as described elsewhere (Parker *et al*, 2002). Collection of tissue cores was carried out under highly controlled conditions. Two cores were used for each case.

Four composite high-density TA blocks were designed, and serial 5- μ m sections were consecutively cut with a microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and transferred to adhesive-coated slides. One section from each TA block was stained with haematoxylin and eosin, and these slides were then reviewed to confirm that the sample was representative of the original tumour. Immunohistochemistry was carried out on these sections of TA fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin using a TechMate TM50 autostainer (Dako, Glostrup,

Denmark). Antibodies for MMPs and TIMPs were obtained from Neomarker (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA). The dilution for each antibody was established based on negative and positive controls (1/50 for MMP-2, -7 and -14, and TIMP-2 and -3; 1/100 for MMP-1, -9 and -13, and TIMP-1; and 1/200 for MMP-11).

Tissue sections were deparaffinised in xylene, and then rehydrated in graded concentrations of ethyl alcohol (100, 96, 80, 70%, then water). To enhance antigen retrieval only for some antibodies, TA sections were microwave-treated (H2800 Microwave Processor, EBSciences, East Granby, CT, USA) in citrate buffer (Target Retrieval Solution, Dako) at 99°C for 16 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the slides in peroxidase-blocking solution (Dako) for 5 min. The EnVision Detection Kit (Dako) was used as the staining detection system. Sections were counterstained with haematoxylin, dehydrated with ethanol and permanently coverslipped.

Tissue arrays analysis

For each antibody preparation studied, the location of immunoreactivity, percentage of stained cells and intensity were determined. All the cases were semiquantified for each protein-stained area. An image analysis system with the Olympus (Münster, Germany) BX51 microscope and analysis soft (analySIS, Soft imaging system, Münster, Germany) was used as follows: tumour sections were stained with antibodies according to the method explained above and counterstained with haematoxylin. There are different optical thresholds for both stains. Each core was scanned with a $\times 400$ -power objective in two fields per core. Fields were selected searching for the protein-stained areas. The computer program selects and traces a line around antibody-stained areas (red spots correspond to higher optical thresholds), with the remaining, non-stained areas (haematoxylin-stained tissue with lower optical threshold) standing out as a blue background. Any field has an area ratio of stained (red) vs non-stained areas (blue). A final area ratio was obtained after averaging two fields. To evaluate immunostaining intensity, we used a numerical score ranging from 0 to 3, reflecting the intensity as follows: 0, no staining; 1, weak staining; 2, moderate staining; and 3, intense staining. Using an Excel spreadsheet, the mean score was obtained by multiplying the intensity score (I) by the percentage of stained cells (Liu *et al*, 2001) and the results were added together (total score: $I \times PC$). This overall score was then averaged with the number of cores that were done for each patient. If there was no tumour in a particular core, then no score was given. In addition, for each tumour, the mean score of two core biopsies was calculated.

Furthermore, whole-tissue sections from blocks from a subset of ten cases for either tumour, PINs or BPH specimens, were compared with the corresponding TA discs, regarding each MMP and TIMP expression. Those cases were selected randomly, and the obtained clinicopathological data were very similar to those from the whole series. Each whole-tissue section was scanned with a $\times 400$ -power lens in ten different fields. Fields were selected searching for the protein-stained areas, such as it was described above.

Data analysis and statistical methods

Differences in percentages were calculated with the χ^2 -test. Immunostaining score values for each protein were expressed as median (range). Comparison of immunostaining values between groups was made with the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests. For metastasis-free survival analysis, we used the Cox univariate method. Cox regression model was used to examine interactions of different prognostic factors in a multivariate analysis. Expression profiles were analysed by unsupervised hierarchical clustering method that organises proteins in a tree

structure, based on their similarity. Data were reformatted as follows: -'3' designated negative staining, '3' positive staining, missing data were left blank. The score values were reformatted (positive-negative) choosing the median as cutoff value. We used the Cluster 3.0 program (average linkage, Pearson's correlation). Results were displayed with Treeview (Eisen *et al*, 1998). The SPSS 17.0 software was used for all calculations (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

More than 2600 determinations were performed on TAs from 133 patients with clinically localised prostate carcinoma, from 20 patients with PIN, from 50 patients with BPH specimens and controls. Minimal internal variance of score data between duplicate tissue cores from the same patients was detected in TAs, showing a high agreement for each protein ($r > 0.95$ and $P < 0.0001$, for each protein). In the validation study, there was a total concordance in the global expression, as well as in the intensity of immunostaining, for each MMP and TIMP between TAs and the corresponding whole-tissue sections. In addition, there were highly significant correlations in the immunostaining scores between these two-paired sets ($r > 0.90$ and $P < 0.0001$, for each protein).

Figure 1 shows some examples of TAs with immunostaining for each protein evaluated. Immunostaining for all the proteins studied was localised predominantly in tumour cells, but also in stromal cells of a significant percentage of prostate carcinomas. However, immunostaining for all the proteins studied was predominantly localised in epithelial cells when prostate benign pathologies were analysed (Figure 2).

As Table 2 shows, we first compared the crude expression of score values for MMPs and TIMPs between PINs, HBP and prostate carcinomas. Prostate carcinomas had higher expression of all MMPs and TIMPs compared with benign pathologies.

It is also noteworthy that there was a wide variability in the immunostaining score values for each protein in prostate carcinomas, which spread more widely than those score values in benign pathologies (Table 2).

We also evaluated the possible relationship between MMPs and TIMPs expressions and clinicopathological factors of prostate carcinomas, such as age of patients, tumour stage, histological grade and pre-treatment serum levels of PSA. Our results only showed significant association of TIMP-1 with histological grade. Thus, tumours with higher score values for TIMP-1 had a higher percentage of cases with high Gleason score (score 2-4: (number of cases (percentage) 14 (21.2); score 5-6: 31 (47); score 7-10: 21 (31.8)) compared to tumours with lower score values for TIMP-1 (score 2-4: 4(6); score 5-6 (53.7); score 7-10: 27 (40.31)) ($P = 0.036$).

With regard to outcome from patients with prostate carcinomas, our results showed a significant association between score values of MMP-11 or -13 and biochemical recurrence. Patients with tumours showing MMP-11 or -13 score values greater than median had a significant higher probability of biochemical recurrence than those patients with lower MMP-11 or -13 score values ($P = 0.02$ and $P = 0.001$, respectively) (Figures 3A and B, respectively).

In addition, to identify specific groups of tumours with distinct MMP/TIMP expression profiles the data were analysed by unsupervised hierarchical cluster analysis. The algorithm orders proteins on the horizontal axis and samples on the vertical axis based on similarity of their expression profiles. When we dichotomised cases with regard to their score values as using the median value for each MMP or TIMPs as cutoff point were considered, a dendrogram showing a first-order division of the tumours into two distinct MMP/TIMP molecular profiles were obtained. In this way, one of them was designated as group 1 with a high MMPs/TIMPs expression profile ($n = 70$) and the other

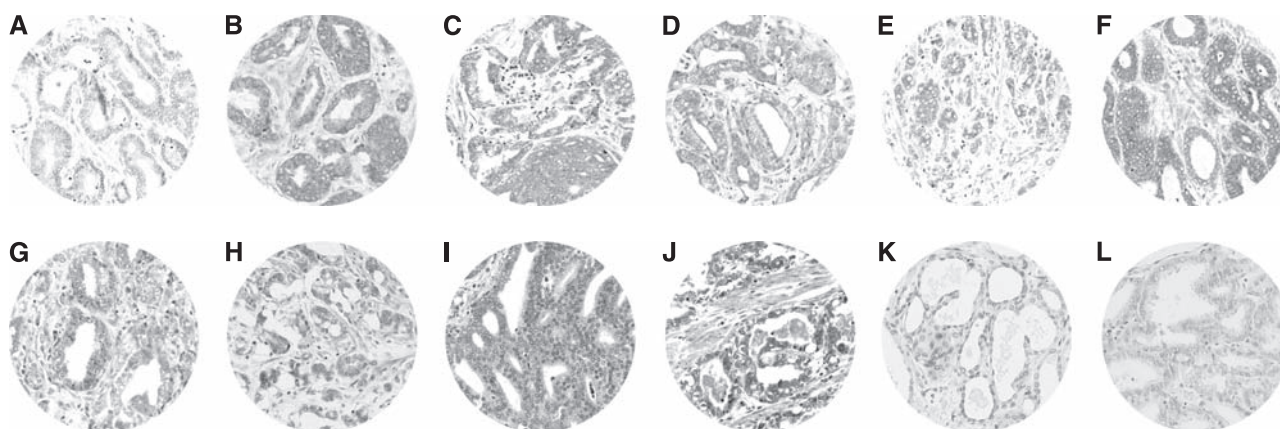


Figure 1 Examples of tissue arrays (TAs) with immunostaining for each protein evaluated in prostate carcinoma. (A) Matrix metalloproteinase (MMP)-1, (B) MMP-2, (C) MMP-7, (D) MMP-9, (E) MMP-11, (F) MMP-13, (G) MMP-14, (H) tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1, (I) TIMP-2, (J) TIMP-3, (K) normal tissue and (L) tumour with IgG.

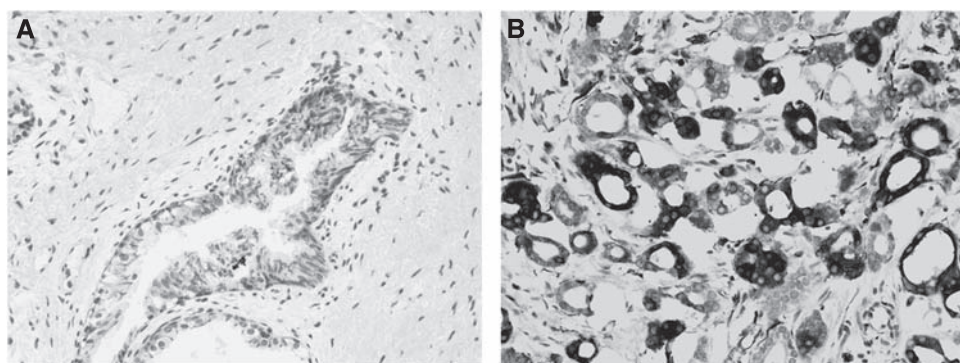


Figure 2 (A) Example of immunostaining for matrix metalloproteinase (MMP)-14 in prostate benign pathology. Magnification: $\times 200$. (B) Example of immunostaining for MMP-14 in prostate carcinoma. Magnification: $\times 200$.

Table 2 Comparative analysis of the score values of expressions of metalloproteinases and their inhibitors in benign prostate pathology and in prostate carcinomas

Factor	Score values (median (range))			P-value
	PIN (n = 20)	BPH (n = 50)	Prostate cancer (n = 133)	
MMP-1	0 (0–47.9)	0 (0–62.43)	104.5 (0–245.1)	$P < 0.001$
MMP-2	0 (0–32.6)	0 (0–44.6)	42.7 (0–239.6)	$P < 0.001$
MMP-7	43.76 (0–61.4)	45.44 (0–75.7)	52.75 (0–235.5)	$P < 0.001$
MMP-9	0 (0–25.84)	0 (0–24.96)	39.33 (0–123.9)	$P = 0.003$
MMP-11	27.27 (0–50.18)	0 (0–68.6)	111.15 (0–275.5)	$P < 0.001$
MMP-13	0 (0–40)	0 (0–50.23)	42.2 (0–151.7)	$P < 0.001$
MMP-14	0 (0–39.06)	35.46 (0–89.35)	32.9 (0–290)	$P < 0.001$
TIMP-1	0 (0–56.32)	0 (0–54.78)	33.9 (0–120.8)	$P < 0.001$
TIMP-2	0 (0–43.7)	0 (0–41.87)	52.16 (0–238.8)	$P < 0.001$
TIMP-3	24.86 (0–53.45)	28.61 (0–60.95)	43.35 (0–238.76)	$P < 0.001$

Abbreviations: BPH = benign prostatic hyperplasia; MMP = matrix metalloproteinase; PIN = prostatic intraepithelial neoplasm; TIMP = tissue inhibitors of metalloproteinase.

was designed as group 2 ($n = 63$) with a low MMPs/TIMPs expression profile (Figure 4). In addition, our results showed significant differences in prognosis between the two groups of patients corresponding to these two types of tumours, corresponding cases with high MMPs/TIMPs expression profile tumours with those patients with higher risk of biochemical recurrence (Table 3 and Figure 3C).

Multivariate analysis according to Cox model showed that tumour stage (PT 3–4: relative risk, RR = 3.38; 95% confidence interval, CI = 1.7–6.5; $P < 0.0001$) and Gleason grading 7–10: 2.08 (1.1–3.9); $P < 0.05$) were significantly and independently associated with biochemical recurrence. However, this same analysis also showed that expressions of MMP-13, as well as clustering for score values, were also independent

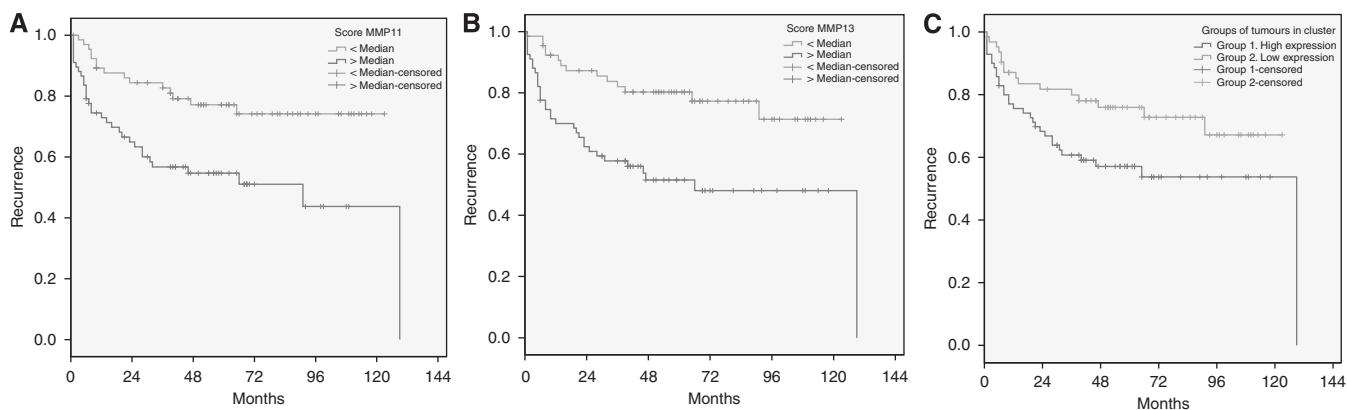


Figure 3 Probability of biochemical recurrence as function of score values for matrix metalloproteinase (MMP)-11 (**A**), score values for MMP-13 (**B**) and as function of the two major clusters of tumours (Groups 1 and 2) (**C**). Median value of score values was chosen as cutoff value.

factors associated with biochemical recurrence in patients with prostate cancer (Table 3).

DISCUSSION

Our results clearly showed higher MMPs and TIMPs expressions in prostate carcinomas than either in PIN or in BPH, which seems to reflect an important mechanism in the molecular biology of prostate cancer. Similarly, some authors found significantly higher expressions of MMP-1, -2 and -9 in prostate cancer tissues than in BPH tissues (Zhong *et al*, 2008). This seems to indicate that high expressions of MMPs and TIMPs might identify prostate benign lesions with risk to develop cancer or even associated to undetected malignant lesions. Therefore, these findings could be of importance with regard to design preventive strategies and/or for further studies of prostate cancer prevention based on enzymatic inhibition of the MMPs/TIMPs system. Our finding that stromal expression was found in cancer but not in BPH, where the MMPs were localised in glandular epithelial cells, was also especially remarkable. We speculate that these findings may be due to epithelial-mesenchymal transition. In this way, mesenchymal cells may again acquire a differentiated epithelial phenotype through a mesenchymal-to-epithelial transition, which might mean in terms of the metastatic process.

Our data also support the biological heterogeneity of prostate carcinomas regarding the expressions of these parameters implicated in tumour invasion and metastasis. The MMPs are implicated in basic processes of tumour progression, such as degradation of basement membrane and extracellular matrix, stimulation of cellular proliferation, cellular motility, resistance to apoptosis and angiogenesis. Therefore, the diverse clinical evolution of prostate tumours may depend their expressions of MMPs and TIMPs. Our results indicating an association between TIMP-1 expression and higher tumour grade were especially remarkable. This suggests that TIMP-1 is associated with aggressive behaviour in prostate carcinomas. If TIMPs inhibit MMPs *in vivo*, it should be expected that high levels of these inhibitors would prevent tumour progression and thus be related with low aggressiveness of tumours. However, TIMPs are multifunctional proteins that, in addition to its MMP-inhibitory effect, also show distinct tumour-stimulatory functions involved in the induction of proliferation and inhibition of apoptosis (Jiang *et al*, 2002; Wurtz *et al*, 2005).

In this study, we also investigated the possible relationship between each one of MMPs or TIMPs expressions and clinical outcome, such as PSA-defined recurrence after radical prostatectomy in our studied population. Our results showed that the global expression of MMP-11 and -13 by prostate carcinomas

correlated with higher incidence rate of biochemical relapse. Therefore, the global expression of MMP-11 and -13 by prostate carcinomas may, in combination with other factors, support useful prognostic information for a more optimal follow-up and treatment from these patients. Likewise, our data led us to consider that MMP-13 and/or MMP-11 may be optimal therapeutic targets for inhibition in prostate carcinoma. These results are in accordance with previous studies that associated expressions of MMP-11 or -13 with poor prognostic in other tumours, such as breast cancer (Gonzalez *et al*, 2007; Vizoso *et al*, 2007).

The MMP-13 (collagenase-3) has been found to have an exceptionally wide substrate specificity when compared with other MMPs (Freije *et al*, 1994; Knauper *et al*, 1997). Moreover, it is thought to have a central role in the MMP activation cascade, both activating and being activated by several other MMPs (MMP-14, -2 or -3). The MMP-13 has been detected to be expressed by different prostate cancer cell lines, prostate cancer tissue and BPH (Varani *et al*, 2001; DeClerck *et al*, 2004; Pang *et al*, 2004). Its expression pattern by prostate cells seemed to be varied according to the malignancy of prostatic cells and, therefore, it has been suggested to be a diagnostic marker for prostate cancer (Morgia *et al*, 2005). In addition, recent report indicated that androgen acts to stimulate the expression level of MMP-13 by LNCaP prostate cancer cell line (Pang *et al*, 2004). It has also been showed that plasma concentrations of MMP-13 were high in patients with metastasis of prostate cancer, and in these patients decreased markedly after the therapy began (Morgia *et al*, 2005).

The MMP-11 (stromalysin-3) is preferential expressed by peritumour stromal cells (Basset *et al*, 1990, 1997) and high levels of MMP-11 were associated with tumour progression and poor prognosis in breast cancer (Chenard *et al*, 1996; Ahmad *et al*, 1998). However, at present there are few data on their expression and clinical signification in prostate cancer. The MMP-11 is a protease that can modulate cancer progression by remodelling extracellular matrix. It cleaves α 1-antitrypsin and IGF-BP1 (Remacle *et al*, 2000). Normal MMP-11 expression is present during embryogenesis and wound healing, and its expression in stressed epithelial cells is detected in the vicinity of fibroblasts (Boulay *et al*, 2001). The MMP-11 expression is observed in the area that surrounds malignant epithelial tumour cells and sometimes in tumour cells of oesophageal, oral, papillary thyroid, colorectal, skin and ovarian carcinomas (Thewes *et al*, 1999; Mueller *et al*, 2000; Soni *et al*, 2003; Wasenius *et al*, 2003; Yamashita *et al*, 2004). Hence, MMP-11 gene expression seems to be associated with tumour progression (Basset *et al*, 1997).

On the other hand, our data also show that it is possible to identify two phenotypes of prostate carcinomas with regard to their global expressions of MMPs/TIMPs. One of these two groups

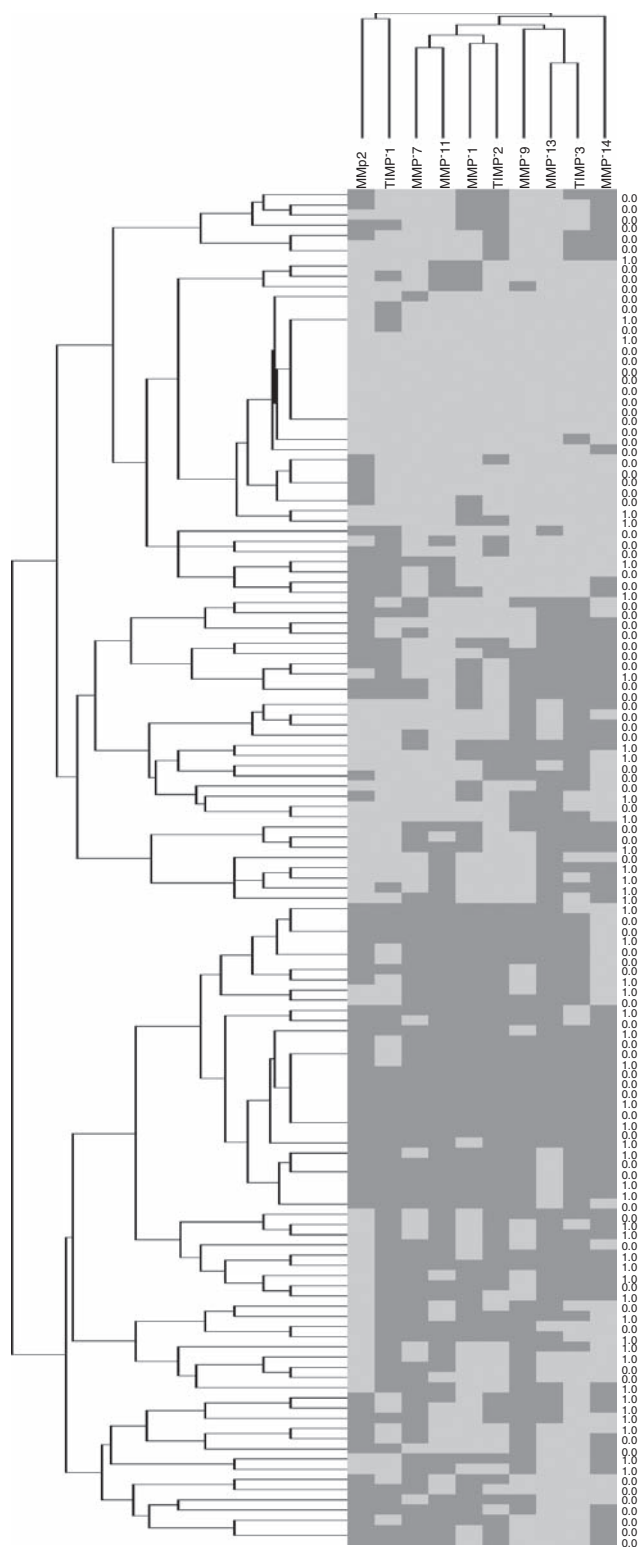


Figure 4 Graphical representation of two-dimensional unsupervised hierarchical clustering results based on immunohistochemistry expression profiles of 10 proteins in 150 prostate carcinoma samples. Rows: samples; columns: proteins. Protein expression scores are depicted according to a colour scale: red: positive staining; green: negative staining; grey: missing data. Dendrogram of samples (to the left of matrix) and proteins (above matrix) represent overall similarities in expression profiles. The status column: 1 = with recurrence; 0 = without recurrence, at the census point. Two major clusters of tumours (1 and 2) are shown for score values and in tumoural cells. The colour reproduction of the figure is available on the html full text version of the paper.

Table 3 Cox univariate (HR) and multivariate (RR) analysis of the relationship between MMPs and TIMPs expression and relapse-free survival

Factor	Event frequency	HR (95% CI)	RR (95% CI)
MMP-1	21/26	1.1 (0.6–2)	1.2 (0.7–2.2)
MMP-2	28/19	0.6 (0.3–1)	0.6 (0.3–1.2)
MMP-7	18/29	1.7 (0.9–3)	1.3 (0.7–2.3)
MMP-9	19/28	1.6 (0.9–2.9)	1.2 (0.6–2.2)
MMP-11	15/32	2.5 (1.3–4.7)**	1.8 (0.9–3.4)
MMP-13	14/33	2.7 (1.4–5.2)***	2.6 (1.4–5)**
MMP-14	18/29	1.6 (0.9–2.9)	1.5 (0.8–2.7)
TIMP-1	20/27	1.5 (0.8–2.8)	1.3 (0.7–2.5)
TIMP-2	19/28	1.5 (0.8–2.8)	1.1 (0.6–2.1)
TIMP-3	21/26	1.3 (0.7–2.3)	1.2 (0.6–2.2)
Cluster 1 vs Cluster 2	16/31	1.9 (1–3.5)*	1.7 (0.9–3.2)*

Abbreviations: CI = confidence interval; HR = hazard ratio; MMP = matrix metalloproteinase; RR = relative risk; TIMP = tissue inhibitors of metalloprotease. ** $P < 0.005$; *** $P < 0.001$; * $P < 0.05$.

had high MMPs/TIMPs expression profile ($n = 70$) and another designed group 2 ($n = 63$) with low MMPs/TIMPs expression profile. Likewise, we found a significant relationship between these phenotypes of prostate carcinomas and biochemical recurrence. Thus, this classification may be relevant in relation to possible further therapies based on MMPs inhibition.

In summary, we found that MMPs/TIMPs expressions were in general higher in prostate carcinomas than in prostate benign tissues, which reflect an important role of these factors in the molecular biology of prostate carcinomas. In addition, there is variability in MMPs/TIMPs expressions in prostate carcinomas, which support the biological heterogeneity of these tumours. In addition, the expression of some MMPs and correlated significantly with prognosis. Thus, our results led us to consider that further studies on MMPs/TIMPs expressions may contribute to understand the biological and clinical behaviour of prostate carcinomas. In this way, further studies are needed to investigate differential profiles of MMPs/TIMPs expressions in patients with advanced prostate cancer that progress to hormone-refractory prostate cancer in spite of androgen-deprivation therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by GLAXOSMITHKLINE, SA.

REFERENCES

- Ahmad A, Hanby A, Dublin E, Poulson R, Smith P, Barnes D, Rubens R, Anglard P, Hart I (1998) Stromelysin 3: an independent prognostic factor for relapse-free survival in node-positive breast cancer and demonstration of novel breast carcinoma cell expression. *Am J Pathol* **152**: 721–728
- Basset P, Bellocq JP, Lefebvre O, Noel A, Chenard MP, Wolf C, Anglard P, Rio MC (1997) Stromelysin-3: a paradigm for stroma-derived factors implicated in carcinoma progression. *Crit Rev Oncol Hematol* **26**: 43–53
- Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P (1990) A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* **348**: 699–704
- Bonfil RD, Dong Z, Trindade Filho JC, Sabbota A, Osenkowski P, Nabha S, Yamamoto H, Chinni SR, Zhao H, Mobashery S, Vessella RL, Fridman R, Cher ML (2007) Prostate cancer-associated membrane type 1-matrix metalloproteinase: a pivotal role in bone response and intraosseous tumor growth. *Am J Pathol* **170**: 2100–2111
- Boulay A, Masson R, Chenard MP, El Fahime M, Cassard L, Bellocq JP, Sautes-Fridman C, Basset P, Rio MC (2001) High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase. *Cancer Res* **61**: 2189–2193

- Bratland A, Ragnhildstveit E, Bjornland K, Andersen K, Maelandsmo GM, Fodstad O, Saatcioglu F, Ree AH (2003) The metalloproteinase inhibitor TIMP-2 is down-regulated by androgens in LNCaP prostate carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* **20**: 541–547
- Brehmer B, Biesterfeld S, Jakse G (2003) Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and their inhibitors (TIMP-1 and -2) in prostate cancer tissue. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **6**: 217–222
- Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U (2000) Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res* **6**: 4823–4830
- Cao J, Chiarelli C, Kozarek P, Adler HL (2005) Membrane type 1-matrix metalloproteinase promotes human prostate cancer invasion and metastasis. *Thromb Haemost* **93**: 770–778
- Cao J, Chiarelli C, Richman O, Zarrabi K, Kozarek P, Zucker S (2008) Membrane type 1 matrix metalloproteinase induces epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer. *J Biol Chem* **283**: 6232–6240
- Cardillo MR, Di Silverio F, Gentile V (2006) Quantitative immunohistochemical and *in situ* hybridization analysis of metalloproteinases in prostate cancer. *Anticancer Res* **26**: 973–982
- Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, Pierce RA, Shapiro SD (1998) Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol* **161**: 6845–6852
- Chenard MP, O'Siorain L, Shering S, Rouyer N, Lutz Y, Wolf C, Basset P, Bellocq JP, Duffy MJ (1996) High levels of stromelysin-3 correlate with poor prognosis in patients with breast carcinoma. *Int J Cancer* **69**: 448–451
- Daja MM, Niu X, Zhao Z, Brown JM, Russell PJ (2003) Characterization of expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **6**: 15–26
- DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, Raz A, Matrisian LM, Sloane BF, Noel A, Hendrix MJ, Coussens L, Padarathsingh M (2004) Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol* **164**: 1131–1139
- Demers M, Couillard J, Belanger S, St-Pierre Y (2005) New roles for matrix metalloproteinases in metastasis. *Crit Rev Immunol* **25**: 493–523
- Dong Z, Bonfil RD, Chinni S, Deng X, Trindade Filho JC, Bernardo M, Vaishampayan U, Che M, Sloane BF, Sheng S, Fridman R, Cher ML (2005) Matrix metalloproteinase activity and osteoclasts in experimental prostate cancer bone metastasis tissue. *Am J Pathol* **166**: 1173–1186
- Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**: 161–174
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14863–14868
- Fingleton B, Vargo-Gogola T, Crawford HC, Matrisian LM (2001) Matrilysin [MMP-7] expression selects for cells with reduced sensitivity to apoptosis. *Neoplasia* **3**: 459–468
- Flemming I, Cooper I, Hemson D (1997) *The 1992 TNM Classification. American Joint Committee on Cancer Staging Manual* 5th edn, JB Lippincott: Philadelphia 219–222.
- Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, Lopez-Otin C (1994) Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* **269**: 16766–16773
- Gohji K, Fujimoto N, Hara I, Fujii A, Gotoh A, Okada H, Arakawa S, Kitazawa S, Miyake H, Kamidono S, Nakajima M (1998) Serum matrix metalloproteinase-2 and its density in men with prostate cancer as a new predictor of disease extension. *Int J Cancer* **79**: 96–101
- Gonzalez LO, Pidal I, Junquera S, Corte MD, Vazquez J, Rodriguez JC, Lamelas ML, Merino AM, Garcia-Muniz JL, Vizoso FJ (2007) Overexpression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in mononuclear inflammatory cells in breast cancer correlates with metastasis-relapse. *Br J Cancer* **97**: 957–963
- Hughes C, Murphy A, Martin C, Sheils O, O'Leary J (2005) Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol* **58**: 673–684
- Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE (2002) Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* **21**: 2245–2252
- Knauper V, Cowell S, Smith B, Lopez-Otin C, O'Shea M, Morris H, Zardi L, Murphy G (1997) The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem* **272**: 7608–7616
- Liu N, Lapcevic RK, Underhill CB, Han Z, Gao F, Swartz G, Plum SM, Zhang L, Green SJ (2001) Metastatin: a hyaluronan-binding complex from cartilage that inhibits tumor growth. *Cancer Res* **61**: 1022–1028
- Logothetis CJ, Lin SH (2005) Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* **5**: 21–28
- Lynch CC, Hikosaka A, Acuff HB, Martin MD, Kawai N, Singh RK, Vargo-Gogola TC, Begtrup JL, Peterson TE, Fingleton B, Shirai T, Matrisian LM, Futakuchi M (2005) MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell* **7**: 485–496
- Manes S, Llorente M, Lacalle RA, Gomez-Mouton C, Kremer L, Mira E, Martinez AC (1999) The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J Biol Chem* **274**: 6935–6945
- Meng MV, Carroll PR, Wein AJ, Kavoussi LR, Noevick AC, Partin AW (2007) Treatment of locally advanced prostate cancer. In *Campbells Urology*, Saunders Elsevier: Philadelphia (eds) 9th edn, 3050–3121.
- Millimaggi D, Mari M, D'Ascenzo S, Carosa E, Jannini EA, Zucker S, Carta G, Pavan A, Dolo V (2007) Tumor vesicle-associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells. *Neoplasia* **9**: 349–357
- Morgia G, Falsaperla M, Malaponte G, Madonia M, Indelicato M, Travali S, Mazzarino MC (2005) Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urol Res* **33**: 44–50
- Mueller J, Steiner C, Hofler H (2000) Stromelysin-3 expression in noninvasive and invasive neoplasms of the urinary bladder. *Hum Pathol* **31**: 860–865
- Nabha SM, Bonfil RD, Yamamoto HA, Belizi A, Wiesner C, Dong Z, Cher ML (2006) Host matrix metalloproteinase-9 contributes to tumor vascularization without affecting tumor growth in a model of prostate cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* **23**: 335–344
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000) Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* **18**: 1135–1149
- Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M (2001) Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* **114**: 111–118
- Overall CM, Lopez-Otin C (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* **2**: 657–672
- Pang ST, Flores-Morales A, Skoog L, Chuan YC, Nordstedt G, Pousette A (2004) Regulation of matrix metalloproteinase 13 expression by androgen in prostate cancer. *Oncol Rep* **11**: 1187–1192
- Parker RL, Huntsman DG, Lesack DW, Cupples JB, Grant DR, Akbari M, Gilks CB (2002) Assessment of interlaboratory variation in the immunohistochemical determination of estrogen receptor status using a breast cancer tissue microarray. *Am J Clin Pathol* **117**: 723–728
- Pulukuri SM, Rao JS (2008) Matrix metalloproteinase-1 promotes prostate tumor growth and metastasis. *Int J Oncol* **32**: 757–765
- Remacle A, McCarthy K, Noel A, Maguire T, McDermott E, O'Higgins N, Foidart JM, Duffy MJ (2000) High levels of TIMP-2 correlate with adverse prognosis in breast cancer. *Int J Cancer* **89**: 118–121
- Riddick AC, Shukla CJ, Pennington CJ, Bass R, Nuttall RK, Hogan A, Sethia KK, Ellis V, Collins AT, Maitland NJ, Ball RY, Edwards DR (2005) Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. *Br J Cancer* **92**: 2171–2180
- Sakr WA, Grignon DJ, Crissman JD, Heilbrun LK, Cassin BJ, Pontes JJ, Haas GP (1994) High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20–69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo* **8**: 439–443
- Semaan M, Jovenin N, Birembaut P, Menard J, Staerman F (2005) [Prognostic value of stromal immunolabelling by MMP-2, MT1-MMP and TIMP-2 in clinically localized prostate cancer]. *Prog Urol* **15**: 250–254
- Soni S, Mathur M, Shukla NK, Deo SV, Ralhan R (2003) Stromelysin-3 expression is an early event in human oral tumorigenesis. *Int J Cancer* **107**: 309–316
- Stetler-Stevenson WG (1999) Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* **103**: 1237–1241
- Thewes M, Worret WI, Engst R, Ring J (1999) Stromelysin-3 (ST-3): immunohistochemical characterization of the matrix metalloproteinase (MMP)-11 in benign and malignant skin tumours and other skin disorders. *Clin Exp Dermatol* **24**: 122–126
- Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Harel F, Tetu B (2003) Significance of MMP-2 expression in prostate cancer: an immunohistochemical study. *Cancer Res* **63**: 8511–8515

- Turk V, Kos J, Turk B (2004) Cysteine cathepsins (proteases) – on the main stage of cancer? *Cancer Cell* 5: 409–410
- Varani J, Hattori Y, Dame MK, Schmidt T, Murphy HS, Johnson KJ, Wojno KJ (2001) Matrix metalloproteinases (MMPs) in fresh human prostate tumour tissue and organ-cultured prostate tissue: levels of collagenolytic and gelatinolytic MMPs are low, variable and different in fresh tissue versus organ-cultured tissue. *Br J Cancer* 84: 1076–1083
- Vizoso FJ, Gonzalez LO, Corte MD, Rodriguez JC, Vazquez J, Lamelas ML, Junquera S, Merino AM, Garcia-Muniz JL (2007) Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer* 96: 903–911
- Wasenius VM, Hemmer S, Kettunen E, Knuutila S, Franssila K, Joensuu H (2003) Hepatocyte growth factor receptor, matrix metalloproteinase-11, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and fibronectin are up-regulated in papillary thyroid carcinoma: a cDNA and tissue microarray study. *Clin Cancer Res* 9: 68–75
- Whitmore W (1956) Hormone therapy in prostatic cancer. *Human Pathol* 21: 273–279
- Wurtz SO, Schrohl AS, Sorensen NM, Lademann U, Christensen IJ, Mouridsen H, Brunner N (2005) Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 12: 215–227
- Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Zhang Z, Kobayashi S, Iwase H (2004) Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Res* 6: R24–R30
- Zhang L, Shi J, Feng J, Klocker H, Lee C, Zhang J (2004) Type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2 and -9) in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 7: 327–332
- Zhong WD, Han ZD, He HC, Bi XC, Dai QS, Zhu G, Ye YK, Liang YX, Qin WJ, Zhang Z, Zeng GH, Chen ZN (2008) CD147, MMP-1, MMP-2 and MMP-9 protein expression as significant prognostic factors in human prostate cancer. *Oncology* 75: 230–236

Copyright of British Journal of Cancer is the property of Nature Publishing Group and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

Copyright of British Journal of Cancer is the property of Nature Publishing Group and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.