

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas

**Valor pronóstico de la expresión de las metaloproteinasas y de sus inhibidores tisulares en células inflamatorias del estroma peritumoral estudiada mediante micromatrices tisulares en piezas de prostatectomía radical.**

Tesis Doctoral (que opta al Grado de Doctor por la Universidad de Oviedo)

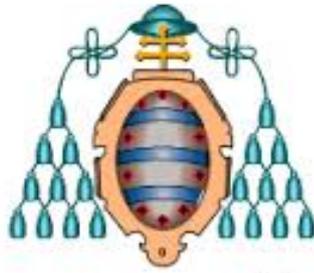
**TESIS DOCTORAL**

**D. ANGEL RODRIGUEZ CORCOS**

DIRECTORES

DR. JESÚS M<sup>º</sup>. FERNANDEZ GÓMEZ

DR. SAFWAN ESCAF



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas

Valor pronóstico de la expresión de las metaloproteinasas y de sus  
inhibidores tisulares en células inflamatorias del estroma peritumoral  
estudiada mediante micromatrices tisulares en piezas de prostatectomía  
radical.

Tesis Doctoral (que opta al Grado de Doctor por la Universidad de Oviedo)

TESIS DOCTORAL

D. ANGEL RODRIGUEZ CORCOS

DIRECTORES

DR. JESÚS M<sup>a</sup>. FERNANDEZ GÓMEZ

DR. SAFWAN ESCAF

Unknown

Con formato: Fuente: (Predeterminado)  
Arial, 12 pt, Negrita



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

<b>1.- Título de la Tesis</b>	
Español: "Valor pronóstico de la expresión de las metaloproteinasas y de sus inhibidores tisulares en las células inflamatorias del estroma peritumoral. Estudiada mediante micromatrices tisulares en piezas de prostatectomía radical".	Inglés: "Value of expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in inflammatory cell peritumoral stroma. Trial using tissue microarrays in radical prostatectomy specimens"

<b>2.- Autor</b>	
Nombre: Angel Rodríguez Corcos	DNI:
Programa de Doctorado: Investigación en Cirugía	
Órgano responsable: Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas	

### RESUMEN (en español)

**Introducción:** Hay nuevas evidencias que la inflamación prostática puede contribuir al carcinoma de próstata. Es importante plantear estrategias de tratamiento más agresivas y establecer un pronóstico más preciso en pacientes con cáncer de próstata. Algunos de los posibles marcadores biológicos para este propósito con las Metaloproteinasas (MMPs) y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas TIMPs.

**Objetivo:** Evaluar la expresión de varias MMPs y TIMPs en células inflamatorias mononucleares en muestras con cáncer de próstata, PIN y Hiperplasia Benigna de Próstata. Investigar su relación con las características clinicopatológicas y biológicas del tumor. Identificar fenotipos de células mononucleares inflamatorias de muestras de prostate benigna con relación a la expresión de las MMPs y lasTIMPs

**Intervenciones:** Las muestras incluidas en el estudio fueron: Grupo 1: 133 muestras con cancer de próstata. Grupo 2: 20 muestras con PIN, y Grupo 3: 50 muestras con hiperplasia benigna de próstata.

- Grupo 1 incluye muestras de hombres con diagnostico histopatológico confirmado de cáncer de próstata entre 1990 and 2001. Fueron seleccionados muestras de hombres con los siguientes criterios de inclusión: carcinoma de próstata invasivos, y un mínimo de 5 años de seguimiento en aquellos hombres con recurrencia tumoral. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: enfermedad metastásica, historia previa de cualquier tipo de tumor maligno, haber recibido cualquier tipo de terapia neo adyuvante. Desarrollo de un Segundo tumor primario, y la ausencia de tejido insuficiente en los bloques de parafina para realizar losTMA's (Tissue Microarrays).
- Grupo 2 incluye 20 muestras con diagnostico histológico confirmado de PIN.
- Grupo 3 incluye 50 muestras con tejido quirúrgico de hiperplasia Benigna de próstata.

**Resultados y limitaciones:** Comparamos la expresión de la MMPS y TIMPa en PIN y HBP con carcinoma de próstata. Nosotros encontramos una mayor expresión de estos factores en el

FOR-MAT-VOA-010-BIS

Unknown

Con formato: Fuente: (Predeterminado)  
Arial, 12 pt



carcinoma de próstata frente al PIN y HBP. La MMP-1 se expresaba en un 92.5% de los carcinomas de próstata frente a solo el 25% en PIN y 0% en HBP. La MMP-2 en 60.9%, 20% y 16%, respectivamente; MMP-9 en 67.7%, 10% y 6%; MMP-11 en 92.5%, 55% y 40%; MMP-13 en 69.9%, 45% y 12%, MMP-14 en 61.7%, 10% y 58%, TIMP-1 en 71.4%, 30% y 28%; TIMP-2 en 71.4%, 30% y 28%; y TIMP-3 en 75.2%, 55% y 58%. Sin embargo nosotros no encontramos diferencias significativas para la expresión de MMP-7 en estos tres tipos de lesiones prostáticas (80.5%, 85% and 70%, respectivamente).

MMP-1 se expresaba por TC en 92.5% de los tumores y en MIC 57.1%; MMP-2 se expresaba por TC en 60.2% y por MIC en 8.3%; MMP-7 se expresaba por TC en 79.7%, y por MIC en 15.8%; MMP-9 se expresaba por TC en 67.7%, y por MIC en 6.8%; MMP-11 se expresaba por TC en 91.7%, y por MIC en 42.1%; MMP-13 se expresaba por TC en 69.2%, y por MIC en 36.8%; MMP-14 se expresaba por TC en 61.7%, y por MIC en 18%; TIMP-1 se expresaba por TC en 71.4%, y por MIC en 32.3%; TIMP-2 se expresaba por TC en 60.9%, y por MIC en 29.3%; y TIMP-3 se expresaba por TC en 72.9% y por MIC en 19.5% de los tumores.

Con relación a la expresión de los MMP y TIMPs por las MIC, nosotros encontramos diferencias en la expresión de algunas MMPs and TIMPs entre la HBP y el carcinoma de próstata. La expresión de la MMP-1 por las MIC se mostro en un alto porcentaje de los casos de carcinoma de próstata (57.1%) mayor que PIN (0%) o HBP (6%). Similar diferencias en la expresión de los MIC se encontraron en MMP-2 (8.3%, 0% y 0%, respectivamente), MMP-9 (6.8%, 0% y 0%), MMP-13 (36.8%, 10% y 4%), MMP-11 (42.1%, 5% y 2%), MMP-14 (18%, 5% y 12%), TIMP-1 (32.3%, 0% y 6%), TIMP-2 (29.3%, 0% y 0%) o para TIMP-3 (19.5%, 0% y 2%). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la expresión para en los MIC para MMP-7 (13.3%, 10% y 6.2%).

**Conclusiones:** Aunque no se ha demostrado un papel en el pronóstico del cáncer de próstata localizado, las MMPs en MICs pueden servir como marcadores tisulares de la potencial existencia de un tumor en caso de biopsias negativas de próstata y servir junto a otros marcadores como guía para seleccionar pacientes que requerirán una re biopsia

Unknown

Con formato: Fuente: (Predeterminado)  
Arial, 12 pt



#### RESUMEN (en Inglés)

**Background:** The identification in these infiltrates of a phenotype of inflammatory mononuclear cells associated with prostate cancer risk and/or an aggressive behaviour may be of great clinical interest. It allows identifying men at risk of developing prostate cancer. Secondly, it allows selecting patients with prostate cancer who should be candidates to more aggressive treatment strategies and to better precise prognosis in patients with clinically detected prostate cancer. Some of the possible biological markers for this purpose are Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tisular Inhibitors of Matrix Metalloproteinases TIMPs.

**Objective:** To evaluate the morphological expression of several MMPs and TIMPs in specimens with prostate cancer, PIN and Hyperplasia Benign Protate by mononuclear inflammatory cells. To investigate their relationship with clinicopathological and biological characteristics of the tumors. To search for phenotypes of mononuclear inflammatory cells in prostate benign tissues, with regard to the expression of MMPs and TIMPs

- Group 1 includes specimens from men with histological confirmed diagnosis of prostate cancer between 1990 and 2001. They will be selected specimens of men with the following inclusion criteria: invasive prostate carcinomas, and a minimum of five years of follow-up in those men without tumoral recurrence. The exclusion criteria will be the following: metastatic disease at presentation, prior 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 the TMAs (Tissue Microarray).
- Group 2 includes 20 specimens with histologically confirmed diagnosis of PIN.
- Group 3 includes 50 specimens with surgical specimens of benign pathology of prostate.

**Results and limitations:** we compared the expression of MMPs and TIMPs by PIN and HBP with these by prostate carcinomas. We found significantly higher expression of these factors in prostate carcinomas than in PIN or HBP. Thus, MMP-1 was expressed by 92.5% of prostate carcinomas, whereas only by 25% of PIN and 30 % of HPB; MMP-2 by 60.9%, 20% and 16%, respectively; MMP-9 by 67.7%, 10% and 6 %; MMP-11 by 92.5%, 55% and 40%; MMP-13 by 69.9%, 45% and 12%, MMP-14 by 61.7%, 10% and 58%, TIMP-1 by 71.4%, 30% and 28%; TIMP-2 by 71.4%, 30% and 28%; and TIMP-3 by 75.2%, 55% and 58%. However, we found not significant differences for MMP-7 expression in these three types of prostate lesions (80.5%, 85% and 70%, respectively).

MMP-1 was expressed by TC in 92,5% of the tumours and by MIC in 57,1% de CMI; MMP-2 was expressed by TC in 60.2% and by MIC in 8.3%; MMP-7 was expressed by TC in 79.7%, and by MIC in 15.8%; MMP-9 was expressed by TC in 67.7%, and by MIC in 6.8%; MMP-11 was expressed by TC in 91.7%, and by MIC in 42.1%; MMP-13 was expressed by TC in 69.2%, and by MIC in 36.8%; MMP-14 was expressed by TC in 61.7%, and by MIC in 18%; TIMP-1 was expressed by TC in 71.4%, and by MIC in 32.3%; TIMP-2 was expressed by TC in 60.9%,

Unknown

Con formato: Fuente: (Predeterminado)  
Arial, 12 pt



and by MIC in 29.3%, and TIMP-3 was expressed by TC in 72.9 % and by MIC in 19.5% of the tumours.

With regard to the expression of MMPs and TIMPs by MIC, we found differences in the expression of some MMPs and TIMPs between prostate benign pathologies and prostate carcinomas. Thus, expression of MMP-1 by MIC was showed in a higher percentage of cases in prostate carcinomas (57.1%) than PIN (0%) or HPB (6%). Similar differences in MIC expression were found for MMP-2 (8.3%, 0% and 0%, respectively), MMP-9 (6.8%, 0% and 0%), MMP-13 (36.8%, 10% and 4%), MMP-11 (42.1%, 5% and 2%), MMP-14 (18%, 5% and 12%), TIMP-1 (32.3%, 0% and 6%), TIMP-2 (29.3%, 0% and 0%) or for TIMP -3 (19.5%, 0% and 2%). However, we found not significant differences in expression for MIC for MMP-7 (13.3%, 10% and 6.2%).

**Conclusions:** 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, so by tumor cells as by intratumoral stromal cells, which support the biological heterogeneity of prostate carcinomas. We found not a phenotype of mononuclear inflammatory cells associated with prostate cancer, our results led us consider that further studies on MMPs/TIMPs expression may contribute to understand the biological and clinical behaviour of prostate carcinomas.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE CIRUGIA Y ESPECIALIDADES MEDICO QUIRURGICAS  
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Unknown

Con formato: Fuente: (Predeterminado)  
Arial, 12 pt

DEDICATORIA:

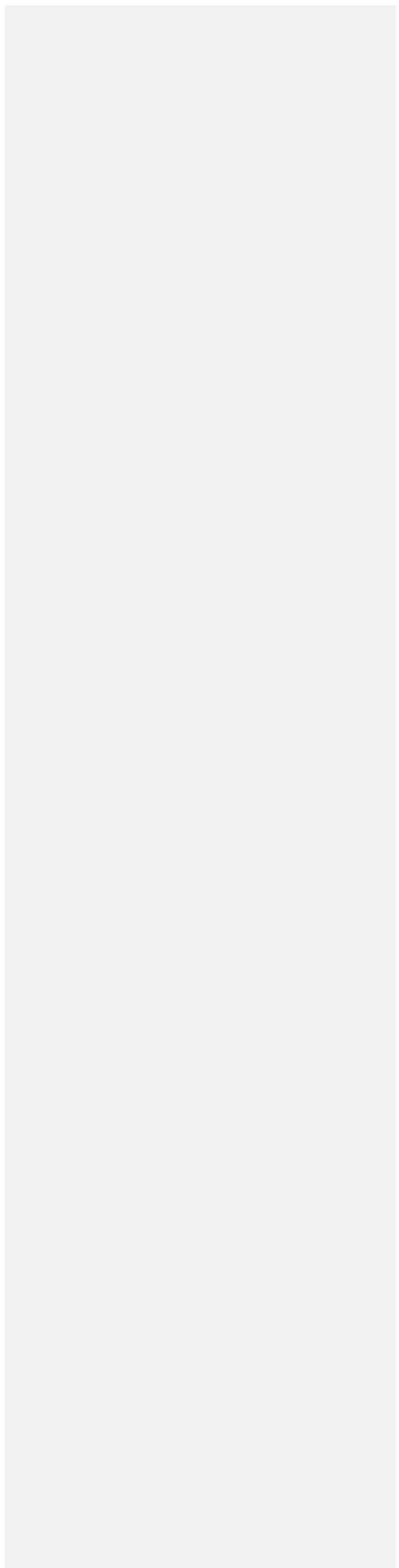
A mi familia, referente y eje de mi vida

A mis amigos

A los pacientes

AGRADECIMIENTOS:

|



## LISTADO DE ABREVIATURAS

**AJCCS:** American Joint Committee on Cancer Staging

**ARNm:** Acido Ribonucleico mensajero

**ASP:** Aspartato

**bFGF:** Factor Fibroblástico de Crecimiento Básico

**BRCA1:** Breast Cancer Gen 1

**BRCA2:** Breast Cancer Gen 2

**CeT;** Células tumorales

**CP:** Cáncer de próstata

**CPRC:** Carcinoma de próstata resistente a la castración

**cT:** Estadio Clínico

**CT:** Células tumorales

**DE:** desviación estandar

**DHT:** Dihidrotestosterona

**EAU:** Asociación Europea de urología

**ER:** Receptor estrogénico

**ERSPC:** European research study for screening of Prostate Cancer

**GR:** Grado de recomendacion

**GY:** Gray

**HBP:** Hiperplasia Benigna de próstata

**HDR:** High Dose Radiotherapy ( Altas dosis de Radioterapia)

**IC:** Intervalo de Confianza

arc24638 28/9/15 20:21

Con formato: Fuente: Sin Negrita

**IGRT:** Radioterapia guiada por imágenes

**IMRT:** Radioterapia de intensidad modulada

**IL-1:** Interleukina-1

**IL-6:** Interleukina-6

**IL-8:** Interleukina-8

**IPSS:** International Prostate Symptoms Score (Puntuación internacional de síntomas prostáticos)

**ISUP:** International Society of Urological Pathology

**KDa:** Kilo Dalton

**LDR:** Low Dose Radiotherapy ( Bajas dosis de radioterapia)

**LHRH:** Hormona liberadora hormona luteinizante

**LE:** Linfadenectomía Extendida

**MEC:** Matriz Extracelular

**MIC:** Celulas inflamatorias mononucleares

**MMPs:** Matrix Metaloproteinasas

**MMP-2:** Metaloproteinasa 2

**MMP-3:** Metaloproteinasa 3

**MMP-9:** Metaloproteinasa 9

**MMP-13:** Metaloproteinasa 13

**MMPis:** Inhibidores Matrix Metaloproteinasas

**MRI-DW:** Magnetic Resonance Imaging-Diffusion Weighted

**MTA:** Manual Tissue Arrayer

**MT-MMPs:** Metaloproteinasas de Membrana

**N:** Ganglios

**NCCN:** National Comprehensive Cancer Network

**NHANES:** National Health and nutrition Examination Survey

**PB:** Progresión Bioquímica

**PCR:** Proteína C reactiva

**PIN:** Neoplasia Intraepiteial prostática

**PR:** Prostatectomia radical

**PU:** Plasminógeno urokinasa

**PUR:** Receptor plasminógeno urokinasa

**PSA:** Antígeno prostático específico

**PSADT:** Tiempo de duplicación del PSA

**RA:** Receptor Androgénico

**RM:** Resonancia Magnetica

**ROC:** Curva Receptor Operador

**RTU:** Reseccion Transuretral

**RT-PCR:** Reaccion en Cadena de la Polimerasa mediante Transcriptasa Inversa

**RT-3D:** Radioterapia Tridimensional

**SCE:** Supervivencia Cáncer específica

**SG:** Supervivencia General

**TA:** Tissue Array

**TC:** Tomografia Axial Computerizada

**TDA:** Terapia deprivación androgénica

arc24638 29/9/15 11:13

Eliminado:

**TIMP1:** Inhibidor Tisular de MMP2

**TIMP2:** Inhibidor Tisular de MMP9

**TIMPs:** Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	15
1.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	
1.1.1. Incidencia y prevalencia del cáncer prostático.....	16
1.1.2. Mortalidad cáncer especifica .....	18
1.1.3. Etiopatogenia y factores de riesgo .....	18
1.1.4. Diagnóstico y clasificación del cáncer de próstata y grupos de riesgo en los tumores localizados .....	21
1.1.5. Cribado de Cáncer de próstata.....	24
1.1.6. La terapéutica del cáncer prostático localizado.....	26
1.1.7. Seguimiento tras tratamiento radical.....	31
1.2. ESTADO ACTUAL DE LAS METALOPROTEINASAS	
1.2.1. La familia de las metaloproteinasas de la Matriz (MMPs).....	32.
1.2.2. Metaloproteinasa de la Matriz tipo 2 ( MMP-2).....	39
1.2.3. Metaloproteinasa de la Matriz tipo 9 ( MMP-2).....	40
1.2.4. Inhibidor tisular de metaloproteinasas.....	41
1.2.5. Papel diagnostico y pronostico de MMPs y TIMP en la enfermedad neoplásica y en el cáncer de próstata.....	42
1.2.6. Nuevos abordajes terapéuticos con inhibidores sintéticos de MMPs.....	43
1.3. EXPERIENCIA PREVIA DE NUESTRO GRUPO	
1.3.1. Papel de las MMP y TIMP en el cáncer de mama y Próstata.....	45
1.3.2. Metaloproteinasas en el cáncer de próstata.....	49

<b>2.</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	
2.1.	HIPOTESIS DE TRABAJO.....	51
2.2.	OBJETIVOS PROPUESTOS.....	52
<b>3.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
3.1.	PACIENTES Y TIPOS DE MUESTRAS.....	55
3.2.	METODOLOGIA DIAGNÓSTICA DE TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO EN ESTOS TUMORES.....	56
3.3.	METODOLOGÍA DE LABORATORIO	
3.3.1.	Selección de bloques de parafina.....	58
3.3.2.	Elaboración de las mallas de tejido.....	58
3.3.3.	Análisis inmuno histoquímico.....	60
3.3.4.	Análisis de las tinciones inmunohistoquímicas.....	61
3.4.	METODO ESTADÍSTICO.....	
3.4.1.	Estadística descriptiva.....	63
3.4.2.	Análisis de supervivencia (Método de Kaplan-Meier).....	64
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	
4.1.	EXPRESIÓN DE LAS MMP Y TIMP EN LAS CÉLULAS MONOCNucleares INFLAMATORIAS EN CP, PIN Y HBP.....	68

4.2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE MMPS Y TIMPS POR CÉLULAS INFLAMATORIAS MONONUCLEARES EN PATOLOGÍA PROTÁTICA BENIGNA Y CP.....	72	
4.3. RELACION ENTRE LAS EXPRESIONES DE LAS MMPS Y LOS TIMPs EN LAS CÉLULAS MONOCNUCLEARES INFLAMATORIAS Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICO PATOLÓGICAS EN PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA.....	74	arc24638 29/9/15 11:27 <b>Eliminado: 3</b>
4.4. RELACION ENTRE LA EXPRESIÓN DE MMPS Y TIMPS EN LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS Y LA RECIDIVA BIOQUÍMICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA LOCALIZADO.....	76	arc24638 29/9/15 11:27 <b>Eliminado: 5</b>
4.5. IDENTIFICACIÓN DE UN FENOTIPO EN LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS PERITUMORALES EN RELACIÓN CON LAS MMPS Y LOS TIMPS, ESPECÍFICO DE TEJIDO TUMORAL Y DE TEJIDO PROSTÁTICO NO NEOPLÁSICO.....	77	arc24638 29/9/15 11:27 <b>Eliminado: 6</b>
5. DISCUSIÓN.....	79	arc24638 29/9/15 11:27 <b>Eliminado: 8</b>
6. CONCLUSIONES.....	91	arc24638 29/9/15 11:27 <b>Eliminado: 87</b>
7. BIBLIOGRAFÍA.....	93	arc24638 29/9/15 11:28 <b>Eliminado: 89</b>



## 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

### 1.1.1. Incidencia y prevalencia del cáncer prostático

El cáncer de próstata (CP) es el cáncer más frecuentemente diagnosticado en varones norteamericanos, que representan el 27% del total de nuevos diagnósticos de cáncer. Se estima que en 2015 habrá 233.000 nuevos casos y 29.480 muertes relacionadas con el cáncer de próstata [1].

El CP es el más frecuentemente diagnosticado entre los hombres españoles. Con una incidencia de 65,2 por cada 100.000 habitantes por año (27.853 nuevos casos anuales del 21,7% del total de cáncer en los hombres), es en general el segundo tipo de cáncer más frecuente en España [2].

La incidencia de CP se ha incrementado en las últimas décadas, en parte debido al uso más frecuente de las herramientas de diagnóstico tales como el antígeno prostático específico (PSA) y las biopsias con aguja en varones asintomáticos [3,4].

En 2013 la incidencia fue de 14,9 millones de casos de cáncer y 8,2 millones de muertes en el mundo. La probabilidad de desarrollar CP es de 1 de cada 15 hombres entre el nacimiento y la edad de 79 años. Las tasas de incidencia por 100.000 en el año 2013 fueron más bajas en Asia meridional, Asia oriental y Asia central y la incidencia mayor en América del Norte, el Caribe y Australia [5].

En Europa la incidencia del CP ha aumentado desde la década de los 90 (7% anual) [6]. El aumento de la incidencia de CP observado en España es similar al observado en otros países, y puede explicarse por una información de mayor calidad, pero sobre todo por 3 factores: el aumento de la esperanza de vida (con el consecuente envejecimiento de la población), la utilización del PSA desde finales de los 80, que permite la detección del CP en fases más tempranas y la existencia de más y mejores métodos diagnósticos [7].

En 2012, la mortalidad estimada asociada con el CP fue de 5.481 en España y 307.471 en todo el mundo, por lo que es la tercera causa principal de muerte por cáncer en hombres en España (8,6% del total) y la sexta causa principal de todo el mundo (6,6% del total) [3]. Además, el CP afecta significativamente la calidad de vida de los pacientes [8].

Las nuevas opciones de tratamiento han mejorado las estrategias terapéuticas y por ello las tasas de mortalidad del CP se han reducido significativamente en la última década. Los nuevos fármacos orales como el acetato de abiraterona (un inhibidor de la síntesis de andrógenos suprarrenales) y enzalutamida (un inhibidor de la señalización del receptor de andrógenos) inhiben la vía del receptor androgénico (RA) que permanece activa en el CP resistente a la castración (CRPC), a pesar de la terapia de privación de andrógenos debido a los niveles de andrógenos residuales [9].

La introducción de otros tratamientos como cabazitaxel, un agente quimioterápico [10], sipuleucel-T tratamiento inmunoterápico basado en células antológicas[11], y más recientemente, el radio-22, un pionero emisor de radiofármaco clase  $\alpha$  [12], la perspectiva de aumento global de la supervivencia en los hombres con metástasis CRPC ha mejorado significativamente.

A pesar de este aumento del arsenal terapéutico, actualmente hay una ausencia de biomarcadores claramente definidos para la selección de pacientes respondedores y para predecir la respuesta al tratamiento.

Con una mayor comprensión de la biología del CP y el perfeccionamiento de las herramientas de predicción, con el desarrollo de nuevos marcadores biológicos, podrían establecerse estrategias personalizadas de manejo del paciente, que facilitasen la estratificación de los pacientes permitiendo identificar a las poblaciones que puedan ser susceptibles de tener el tratamiento más específico y mejor para cada individuo.

### **1.1.2. Mortalidad cáncer específica**

En España la mortalidad por CP experimentó un ligero aumento en el periodo 1951-1970 [40]; desde entonces hasta mediados de los 80 la mortalidad se estabilizó [41] y continuó estable hasta mediados de los 90, donde comenzó a descender tanto en el ámbito nacional como en las comunidades autónomas [42]. Pese a ello, un reciente trabajo muestra una estabilización de las tasas de mortalidad por CP a nivel nacional en el periodo 2008-2011 (porcentaje de cambio anual: 0,3% no significativo)[43].

En 2013 el cáncer de próstata causó el 9% de las muertes por cáncer en varones en España, ocupando el tercer lugar, detrás del cáncer de pulmón (26%) y del cáncer de colon (10%) [44].

Basándose en los datos del Instituto Nacional de Estadística Cayuela et al [44] mostraron que las tasas brutas de mortalidad se incrementan en España entre el periodo 1980-2013 (1,1% anual;  $p < 0,05$ ) pasando de 17,0 defunciones por 100.000 varones-año en 1980 a 25,2 en 2013. Las tasas ajustadas (globales) por edad en España descienden de 21,7 a 15,4 defunciones por 100.000 varones-año entre los años extremos del periodo estudiado (PCA: -0,9%;  $p < 0,05$ ).

### **1.1.3. Etiopatogenia y factores de riesgo**

El CP tiene un origen multifactorial entre las posibles causas se incluyen factores hormonales, genético y ambientales. No están claras las causas que determinan el inicio y progresión del CP.

La edad es uno de los mayores factores de riesgo para el CP, con alrededor del 85% de todos los casos diagnosticados en los mayores de 65 años y una incidencia estimada de sólo el 0,1% de los menores de 50 años [13]. La

historia familiar también es un factor de riesgo [14] y se estima que aproximadamente el 10.5% tienen antecedentes familiares. Si un familiar de primer grado tiene CP, el riesgo se duplica. Cuando más de dos familiares de primer grado presentan la enfermedad, el riesgo se incrementa entre 5 y 11 veces [15].

La raza es otro factor de riesgo importante de aparición y mortalidad por CP siendo bajo en la raza asiática, moderado en la raza blanca y alto en la raza negra [16].

Existen algunos estudios epidemiológicos sobre el impacto de la dieta en el cáncer de próstata que sugieren que un contenido alto en grasa puede ser un factor de riesgo [17].

Se ha encontrado también un vínculo entre el cáncer de próstata y la historia familiar de cáncer de mama que se cree que se debe a los genes BRCA1 y BRCA2 [18].

El CP precisa de andrógenos como la testosterona, o la más potente dihidrotestosterona (DHT), para su desarrollo y crecimiento por lo que es un cáncer andrógeno dependiente. Las células prostáticas son muy sensibles a los andrógenos y regresan con la castración. Los andrógenos esteroideos ejercen sus efectos mediante la unión al receptor androgénico (RA) en el citoplasma y promueve la translocación nuclear. Una vez en el núcleo, promueven la transcripción de genes regulados por andrógenos que controlan el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis.

Por ello, el tratamiento para el cáncer de próstata localmente avanzado y metastásico se dirige al RA para la reducción de los niveles de andrógenos o mediante la inhibición de la activación del RA. Los andrógenos se suprimen por métodos quirúrgicos o químicos utilizando análogos de la hormona LHRH con o sin la adición de antiandrógenos. Inicialmente, los tumores de próstata mejoran en respuesta a la privación de andrógenos en hasta el 80% de los casos [19]. Sin embargo, algunos tumores comienzan a crecer, a

pesar de la continuación del tratamiento antiandrógeno, progresando a metastásico y ocasionando el fallecimiento del paciente en el plazo de 24-48 meses [20].

Existen numerosos estudios epidemiológicos, genéticos, y moleculares indicando que el CP puede tener causas infecciosas e inflamatorias y, además, que no es simplemente consecuencia del envejecimiento [21,22]

Algunos estudios han observado una asociación positiva entre la inflamación de la próstata y el CP, aunque, al ser observacionales, estos estudios tenían algunas limitaciones [23,24,25].

Cada vez hay más evidencias sobre una estrecha relación entre la inflamación sistémica y el desarrollo y progresión del cáncer [26]. Los leucocitos inflamatorios, neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos proporcionan factores solubles que se cree que median en el desarrollo de cáncer.

El estudio epidemiológico publicado en 2015 ,realizado a partir de las encuestas del National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) del 2009-2010 en el que se examinaron las relaciones entre las variables demográficas, la inflamación, la infección, la proteína C reactiva (PCR), y el riesgo de aparición de CP en hombres estadounidenses mayores de 18 años de edad, encontró una relación entre la inflamación crónica resultante de enfermedades infecciosas o no infecciosas y el aumento en el riesgo de CP [27].

Recientemente se ha publicado un estudio que relaciona el recuento de neutrófilos, posible marcador de inflamación sistémica, con la mortalidad en el CP localizado y parece ser un factor pronóstico independiente de mortalidad general [28]. La asociación de la cifra de neutrófilos con la supervivencia encontrado en este estudio está en línea con lo observado en diferentes tipos de cáncer [29,30] y con la creciente evidencia sobre la

importancia pronóstica del recuento de neutrófilos como marcador de la inflamación [31].

Así mismo, la importancia pronóstica del recuento de neutrófilos se ha sugerido recientemente también en el CP metastásico [32]. Existen datos que relacionan la proporción de neutrófilos/linfocitos con la respuesta al tratamiento sistémico y la supervivencia en pacientes con CP resistente a la castración metastásico [32].

Lo anterior apoya la hipótesis de que los neutrófilos puedan contribuir a la progresión del tumor y su comportamiento biológico agresivo mediante la producción de citoquinas como el factor de necrosis tumoral, la interleucina IL-1 y la IL-6, las cuales se cree que promueven la proliferación tumoral y la angiogénesis, así aumentando su potencial metastásico [33].

#### **1.1.4. Diagnóstico y clasificación del cáncer de próstata y grupos de riesgo en los tumores localizados**

El diagnóstico de CP se basa en el tacto rectal y el PSA básicamente y requiere de la confirmación histológica de la biopsia que se hace por indicación de alguno de los parámetros comentados.

El CP raramente es sintomático, siendo asintomático en los estadios iniciales de la enfermedad, la sintomatología suele aparecer en las fases avanzadas de la enfermedad y la clínica es derivada de las metástasis, en su mayoría óseas y en menor frecuencia por infiltración de estructuras locales como la vejiga o recto provocando hematuria o clínica intestinal. El proceso diagnóstico no es el objetivo de esta tesis, por lo que no vamos a desarrollarlo.

El CP una vez diagnosticado se clasifica en grupos de riesgo basado en el estadio T clínico (cT), la puntuación Gleason [45] y el PSA.

El sistema de estadificación del CP según la clasificación TNM de 2009 es la indicada en la Tabla 1 [46].

<b>T: Tumor primario</b>
<b>Tx:</b> El tumor primario no puede evaluarse
<b>T0:</b> No hay evidencia de tumor primario
<b>T1</b> Tumor clínicamente inaparente no palpable o visible por imágenes <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>T1a</b> Tumor hallazgo histológico accidental en 5% o menos del tejido resecado</li> <li>• <b>T1b</b> Tumor hallazgo histológico incidental en más de 5% del tejido resecado</li> <li>• <b>T1c</b> Tumor identificado mediante biopsia con aguja (por ejemplo, debido a la elevación del PSA)</li> </ul>
<b>T2</b> Tumor confinado dentro del próstata <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>T2a</b> Tumor que afecta a la mitad de un lóbulo o menos</li> <li>• <b>T2b</b> El tumor involucra a más de la mitad de un lóbulo, pero no ambos lóbulos</li> <li>• <b>T2c</b> El tumor implica ambos lóbulos</li> </ul>
<b>T3</b> Tumor que se extiende a través de la cápsula prostática <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>T3a</b> Tumor extracapsular (unilateral o bilateral) incluyendo la participación (microscópica) del cuello vesical</li> <li>• <b>T3b</b> Tumor que invade vesículas seminales</li> <li>• <b>T4</b> Tumor invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales: esfínter externo, recto, músculos elevadores, y / o la pared pélvica</li> </ul>
<b>N: Ganglios linfáticos regionales</b>
<b>NX</b> Ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
<b>N0</b> Sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales
<b>N1</b> Metástasis en los ganglios linfáticos regionales
<b>M: Metástasis</b>
<b>MX</b> Metástasis no pueden ser valoradas

<b>M0</b> No hay metástasis a distancia
<b>M1</b> Metástasis a distancia
<b>M1a</b> Ganglios linfáticos regionales
<b>M1b</b> Hueso
<b>M1c</b> Otra localización

**Tabla 1: Clasificación TNM**

**Patrones de Gleason**

La puntuación Gleason se determina por la gradación tumoral realizada por el patólogo al asignar un grado primario al patrón tumoral predominante y un grado secundario al segundo patrón más comúnmente observado [46].

Patrón 1	Muy bien diferenciados, glándulas pequeñas apretadas, uniformes en masas esencialmente circunscritas.
Patrón 2	Similar al modelo 1, pero con una variación moderada en tamaño y forma de las glándulas y más atipia en las células individuales; patrón cribiforme puede estar presente, siendo esencialmente circunscrita, pero más laxo
Patrón 3	Similar al patrón 2 pero marcada irregularidad en tamaño y forma de las glándulas, con pequeñas glándulas o de células individuales invadiendo estroma fuera de masas circunscritas o cordones sólidos y masas con glandular fácilmente identificables diferenciación dentro de la mayoría de ellos.
Patrón 4	Células claras grandes que crecen en un patrón difuso parecido hipernefoma; puede mostrar la formación de la glándula
Patrón 5	Tumores muy poco diferenciados; masas generalmente sólidas o crecimiento difuso con poca o ninguna diferenciación en las glándulas

**Tabla 2: Patrones de Gleason**

La International Society of Urological Pathology (ISUP) en su conferencia de 2005 publicó un nuevo consenso sobre los diferentes patrones publicando el llamado ISUP 2005 Sistema modificado de Gleason [48].

El estadio clínico TNM es insuficiente para establecer el tratamiento adecuado en pacientes con CP localizado. Los pacientes con estadios clínicos localizado o localmente avanzado pueden clasificarse por grupos de riesgo basándose en la clasificación de D'Amico (Tabla 3). Agrupa a los pacientes en tres niveles de riesgo [48].

Bajo Riesgo Localizado	PSA < 10 ngr/ml o Gleason <7 y/o cT1-cT2a
Riesgo intermedio Localizado	PSA 10-20 ng/ml y/o Gleason 7 y/o cT2b
Alto Riesgo Localizado	PSA > 20 ng/ml y/o Gleason > 7 y/o cT2c
Alto Riesgo Localmente Avanzado	Cualquier PSA y/o cualquier Gleason y/o cT3,cT4 ó cN+

**Tabla 3: Clasificación de D'Amico**

#### **1.1.5. Cribado de Cáncer de Próstata**

El PSA es un marcador imperfecto del cáncer de próstata. Aunque altamente específico de la glándula prostática, el PSA no es específico del cáncer de próstata. Anualmente se realizan numerosas biopsias de próstata innecesaria.

Actualmente, el cribado del CP con el PSA es uno de los temas más controvertidos en la literatura urológica, hay grandes estudios publicados sobre el cribado en 2009 [34-35]. Los análisis de los subgrupos de las cohortes que forman parte de grandes estudios, no puede proporcionar la

calidad de la evidencia necesaria para abordar adecuadamente la respuesta a esta pregunta clínica.

- El cribado se asoció con un aumento del diagnóstico de CP (RR: 1,3; IC del 95%: 1,02 a 1,65).
- El cribado se asocia más con enfermedad localizada (RR: 1,79; IC del 95%: 1,19 a 2,70) y menos con el CP avanzado (T3-4, N1, M1) (RR: 0,80; IC del 95%: 0,73 a 0,87).
- A partir de los resultados de cuatro ensayos clínicos randomizados no se observó beneficio en la supervivencia global (RR: 1,00; IC del 95%: 0,96 a 1,03).[36]
- El cribado se asoció con sobrediagnóstico y sobretratamiento.

Desde 2013, los datos del European Research Study for Screening of Prostate Cancer ERSPC [37] se han actualizado con 13 años de seguimiento, demostrando que la reducción de la mortalidad se mantiene sin cambios (21% y 29%).

Existe una dificultad en la utilización del PSA para diferenciar entre pacientes con HBP y pacientes con PIN de cáncer cuando tienen un PSA elevado, y esta dificultad para saber ante que paciente estamos es mayor cuando el rango del PSA de los pacientes está entre 3 y 10 ng/ml. Es en este grupo de pacientes donde otros nuevos marcadores nos pueden ayudar para seleccionar a los pacientes que indicaremos una biopsia de próstata.

El PCA3 puede ayudar como elemento en la elección de pacientes para realizar una biopsia, ya que es un biomarcador específico de la próstata, detectable en los sedimentos de orina obtenidas después de un masaje prostático por tacto rectal [38]. La sensibilidad del PCA3 es superior a la del PSA total y del cociente PSA libre/conjugado para la detección de CP ya que muestra un aumento significativo en el área bajo la curva ROC en el diagnóstico de biopsias positivas. Los valores de PCA3 aumentan con el volumen de CP, pero hay datos contradictorios sobre si se predice de forma independiente del grado Gleason, y su uso para el seguimiento de la

vigilancia activa no está confirmado [39]. Actualmente, la principal indicación del test PCA3 es determinar si es necesaria la repetición de la biopsia prostática tras una inicial negativa.

Existe una clara necesidad de mejores marcadores. Existen datos publicados que han demostrado previamente que un análisis 4K score de cuatro calicreínas: PSA total, PSA libre, PSA intacto y humana calicreína humana peptidasa 2 es altamente predictiva del resultado de biopsia de próstata [62].

La utilización del 4K score test puede aumentar la precisión en la elección de la solicitud de la biopsia prostática en un paciente con elevación del PSA, y retrasar el diagnóstico de un número limitado de tipos de cáncer, la mayoría de los cuales son de bajo grado [63].

Existen datos que demuestran que el PCA3 ha demostrado una precisión en detectar el cáncer de próstata en la biopsia. Los resultados del estudio publicado por Vickers et col [64] mostraron una mayor precisión diagnóstica de las cuatro Calicreínas que la demostrada por el PCA3 frente al PSA en pacientes con Cáncer de próstata.

La identificación de mejores marcadores puede importante reducir las tasas de biopsia innecesarias, y mejorar la toma de decisiones sobre la biopsia.

#### **1.1.6. La terapéutica del cáncer prostático localizado**

##### **Cáncer de Próstata de Bajo Riesgo**

Existen diversas opciones terapéuticas para este tipo de pacientes:

### **Vigilancia Expectante**

La Vigilancia expectante puede ofrecerse a los pacientes que no son elegibles para el tratamiento curativo local y tienen una esperanza de vida corta. Grado de recomendación (GR) A según guías 2015 Asociación Europea de urología (AEU) [49]

Durante la vigilancia expectante, la decisión de iniciar tratamiento no curativo debe basarse en los síntomas y la progresión de la enfermedad GR B. [49]

### **Vigilancia activa**

La vigilancia activa según las guías de la EAU, es una opción terapéutica válida en los pacientes con riesgo bajo de progresión del cáncer, más de 10 años de esperanza de vida, cT1/T2a, PSA <10ng / ml, Gleason de la biopsia <6, <2 biopsias positivas, mínima participación en la biopsia con aguja gruesa (<cáncer de 50% por biopsia). GR A [49].

La EAU recomienda monitorizar al paciente buscando signos de avance de la enfermedad basado en el tacto rectal, niveles de PSA y realización de biopsias prostáticas repetidas. El intervalo de seguimiento óptimo todavía no está claro. GR A [49].

### **Prostatectomía radical**

Es el procedimiento estándar dentro de las opciones terapéuticas para el CP localizado. Debe ofrecerse a los pacientes con una esperanza de vida superior a 10 años. GR A [49]

La linfadenectomía no está indicado en CP de bajo riesgo GR A [49]

La supervivencia libre de enfermedad a los 12 años es del 90% en los pacientes de CP con riesgo bajo- intermedio tratados con prostatectomía radical (PR) [50]. Los pacientes manejados con PR presentan a los 10 años

ausencia de progresión bioquímica en el 68% de los casos, supervivencia libre de enfermedad en el 97% y tasa de supervivencia global del 83% [51].

La PR se asocia con complicaciones precoces como hemorragia intraoperatoria, lesión rectal, trombosis venosa profunda, tromboembolismo pulmonar, linfocela, sepsis urinaria, infección de la herida, íleo intestinal, fistula urinaria y complicaciones tardías como incontinencia urinaria, estenosis de la anastomosis uretrovesical y disfunción eréctil.

Las características de los pacientes tratados con prostatectomía radical han cambiado en España en las últimas décadas (actualmente son más jóvenes, con enfermedad localizada y con niveles más bajos de PSA), con un mejor control local de la enfermedad y mejores tasas de supervivencia libre de progresión y cáncer [52].

### **Radioterapia**

Pacientes con CP de bajo riesgo, sin RTUP previa y con un buen IPSS y volumen prostático <50 ml. GR A

Entre las diferentes opciones disponibles, encontramos la radioterapia tridimensional conformada (RT-3D), radioterapia de intensidad modulada (IMRT) y la radioterapia guiada por imágenes (IGRT). En pacientes con CP de bajo riesgo la dosis total debe ser de 74 a 78 Gy. GR A

Los pacientes presentan una supervivencia libre sin recidiva de PSA a los 8 años con la IMRT a dosis del 81 Gy del 85%, 76% y 72% para los grupos de pacientes de riesgo favorable, intermedio y desfavorable, según la definición de la American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO) [53]

Los pacientes con enfermedad órgano confinada con IMRT a dosis de 86,4 Gy logran una respuesta sin recidiva de PSA a los 5 años (definida como PSA > 2 ng/ml del valor nadir) del 98%, 85% y 70% en los grupos de riesgo bajo, intermedio y alto, respectivamente [54].

Las complicaciones que presentan durante el tratamiento y hasta los 6 meses son diarrea, rectorragia, disuria, polaquiuria, urgencia, hematuria, dolor pélvico y como toxicidad tardía están la proctitis crónica, la estenosis de uretra, disuria y disfunción sexual.

### **Braquiterapia**

Es una opción de tratamiento mínimamente invasivo para pacientes con Gleason  $\leq 6$ , PSA  $\leq 10$ , cT1b-T1c N0M0, Vol prostático  $< 50$  cc, IPSS  $\leq 12$ , evidencia tumoral en cada cilindro  $\leq 50$  %. Consiste en la implantación transperineal y bajo control ecográfico de semillas radiactivas (Paladio 103 o yodo 125). Hay dos modalidades, baja tasa (LDR) 0,4-2 Gy/hora y alta tasa (HDR)  $> 12$  Gy/hora [55, 56].

No existen ensayos aleatorizados que comparen braquiterapia con otras modalidades. Se ha objetivado una supervivencia libre de recurrencia tras 5 y 10 años del 71-93% y 65-85%, respectivamente [57].

### **Terapia focal**

Es una alternativa mínimamente invasiva en el tratamiento del CP localizado para el grupo de pacientes de bajo riesgo, no obstante se encuentra todavía poco estudiada y según las guías de la EAU no puede ser recomendado como una alternativa terapéutica fuera de los ensayos clínicos. GR A

## **Tratamiento Cáncer de próstata localmente avanzado**

### **Vigilancia Activa**

Se debe ofrecer a los pacientes cuando no son elegibles para el tratamiento curativo local y los que tienen una esperanza de vida corta.

El tratamiento diferido con Terapia de Deprivación Androgénica (TDA) puede recomendarse en pacientes asintomáticos M0, con PSA < 50 ng/dl y tiempo de duplicación de PSA (PSADT) > 12 meses y tumor pobremente diferenciado GR A. [49]

### **Prostatectomía radical**

La PR puede ofertarse a los pacientes como una opción de tratamiento en el CP localmente avanzado, de alto riesgo (cT3a o Gleason 8-10 o PSA > 20) y como parte de un tratamiento multimodal en pacientes de muy alto riesgo (cT3b-T4 N0 o cualquier TN1) [49].

No hay datos concluyentes del beneficio de la PR en pacientes N+, porque se ha demostrado una disminución de la supervivencia general (SG) y supervivencia libre de enfermedad en aquellos pacientes en los que se abandonó la cirugía por la existencia de ganglios positivos en biopsia intraoperatoria [58].

### **Terapia deprivación androgénica neoadyuvante - adyuvante**

La deprivación androgénica antes de la PR disminuye los márgenes quirúrgicos y retrasa el tiempo de progresión bioquímica (PB), no está asociada con aumento de la SG y supervivencia cáncer-específica (SCE) [59]. La TPA adyuvante en pacientes con pN+ proporciona un aumento de SG y SCE [60].

### **Radioterapia adyuvante**

Indicada en pacientes pT3 pN0 con alto riesgo de recidiva (márgenes positivos, invasión vesículas seminales, etc.) [61], mejora al menos la

supervivencia bioquímica libre Includido en las Guías de la EAU con un GR A [49].

La dosis total en pacientes con alto riesgo CaP localizado es de 76 a 78 Gy en combinación con tratamiento de deprivación androgénica a largo plazo (se recomienda 2-3 año). GR A [49].

### **Deprivación androgénica**

La TPA forma parte de la terapia multimodal del manejo de la enfermedad, aunque de forma única no es una terapia definitiva en el CP localmente avanzado. Reservado para aquellos pacientes que no quieren o no pueden recibir ningún tipo de tratamiento local y ya sea sintomático o asintomático con un PSA-DT <12 meses y un PSA > 50 ng / ml y un tumor poco diferenciado [49].

#### **1.1.7. Seguimiento tras tratamiento radical**

Aunque la mayoría de los tumores pobremente diferenciados se extienden fuera de la próstata, la incidencia de la enfermedad limitada al órgano es del 26-31%. Los pacientes con tumores de alto grado confinados a la próstata en el examen histopatológico tienen un buen pronóstico después de la PR. Una de las razones para optar por la cirugía es la alta tasa de variabilidad entre la puntuación de Gleason de la biopsia y la puntuación de Gleason de la pieza reseca [65].

La LE de las cadenas pélvicas proporciona información importante para el pronóstico (número de ganglios involucrados, volumen tumoral del ganglio, y perforación capsular del ganglio), que no puede ser igualada por ningún otro procedimiento actual [66].

La linfadenectomía extendida (LE) se debe realizar en todos los casos de varones con CP de alto riesgo, debido a que la probabilidad de ganglios

positivos es del 15-40% [67]. La linfadenectomía limitada no debería realizarse, ya que se deja por lo menos la mitad de los ganglios involucrados [68].

Los pacientes con CP de alto riesgo tienen un mayor riesgo de fracaso terapéutico, con necesidad de terapia secundaria, progresión metastásica y muerte. Sin embargo, no todos tienen un mal pronóstico después de la PR [69].

Briganti et col [70] (C. F. Briganti A 2006) publicaron un nomograma basados en Gleason; PSA y estadio clínico, con el fin de detectar el riesgo de metástasis ganglionar fuera de la fosa obturadora. El estudio concluyó que el Gleason entre 8-10 es el único factor de riesgo independiente. El PSA influye en valores muy elevados (>50 ng/ml). Con este nomograma, pacientes con un bajo riesgo según D'Amico, tienen un riesgo de afectación ganglionar fuera del área obturadora del 0,6%.

## **1.2. ESTADO ACTUAL DE LAS METALOPROTEINASAS**

### **1.2.1. La familia de las metaloproteinasas de la Matriz (MMPs)**

La colonización distante de un cáncer es el resultado de un proceso celular donde intervienen numerosos factores. El trastorno en la regulación del crecimiento celular es debido a cambios genéticos que ocasionan una proliferación incontrolada que puede comenzar la cascada; pero este crecimiento no se convierte en metástasis hasta que un ambiente favorable existe y da forma a la invasión inicial.

Una colonia de células que inicia el proceso de invasión y de metástasis tiene la capacidad de inducir proteínas facilitadoras que actúan a nivel molecular, tanto intra como extra celularmente, que le permitan invadir el estroma, vascularizarse y ser capaz de sobrevivir en este nuevo entorno.

Las células tumorales tienen por objetivo producir un entorno favorable para conseguir la unión a la matriz extracelular del huésped, la proteólisis de las barreras del huésped como la membrana basal, el movimiento de las células tumorales y finalmente la implantación de colonias de las células tumorales en la nueva localización a distancia [71,72].

La matriz extracelular representa una red tridimensional que engloba todos los órganos, tejidos y células del organismo. Constituye un filtro biofísico de protección, nutrición e invasión celular y el terreno para la respuesta inmune, angiogénesis, fibrosis y regeneración tisular. La matriz extracelular (MEC) separa compartimentos tisulares, una combinación de membranas basales y estroma adyacente. Las caras basales de las células epiteliales se unen a la membrana basal. Al lado opuesto se sitúa el estroma intersticial que contiene fibroblastos, miofibroblastos y otras células estromales. Existe un equilibrio, incluso en las fases de remodelación de las poblaciones celulares a cada lado.

Los tumores son tejidos funcionales conectados y dependientes del microambiente. El microambiente tumoral constituido por la MEC, células del estroma y la propia respuesta inmune, son determinantes de la morfología y clasificación tumoral, agresividad clínica, pronóstico y respuesta al tratamiento del tumor [73].

Las células tumorales no siguen los límites naturales del órgano y se localizan en otros tejidos. Este proceso comienza con la transición de carcinoma in situ a carcinoma invasor, en el que las células metastásicas atraviesan la membrana basal del epitelio y acceden al estroma subyacente para interactuar con las células [74,72].

La membrana basal es una estructura con tres láminas, la lúcida, la densa y la reticular. La lamina lucida en contacto con la membrana plasmática del tejido epitelial, la densa con filamentos de colágeno tipo IV y la reticular con fibras más densas reticulares de colágeno tipo II y gran cantidad de glicoproteínas y proteoglicanos que normalmente no contiene poros que

permitan el paso celular pasivo, por lo que se requiere una invasión celular activa para entrar en el compartimiento estromal. Una vez allí las, las células pueden ganar el acceso a vasos linfáticos o a vasos sanguíneos. Barsky et al. subrayaron la asociación entre invasión y defectos en la membrana basal, sugiriendo así que las células invasoras interactúan de manera diferente a las células normales con la membrana basal [74].

El proceso metastásico se establece en tres fases que incluyen, unión a la membrana basal, lisis de la misma y locomoción celular. La unión de las células malignas a la superficie de la membrana basal viene mediada por receptores en las células tumorales que reconocen glicoproteínas de la membrana basal como laminina, fibronectina y colágeno tipo IV [75,76].

La lisis de la membrana basal es facilitada por la producción de proteasas a partir de las células tumorales. Uno de estas enzimas la colagenasa tipo IV, fue descubierto por Liotta a finales de los años 70 [77,78]. El movimiento celular que se conoce como locomoción implica que la célula tumoral se impulsa a través de la membrana basal aprovechando la zona de proteólisis de la matriz [79,80]

Posiblemente el aspecto más importante de la cascada metastásica sea el proceso de degradación de la matriz extracelular por enzimas proteolíticas específicas. La proteólisis de las barreras tisulares no es una propiedad única de los procesos malignos. De hecho, se observa durante la implantación en el trofoblasto, la morfogénesis embrionaria, la remodelación tisular, la invasión bacteriana y la angiogénesis. Pero la diferencia reside en que las células tumorales tienen la habilidad de acoplar sus mecanismos proteolíticos con una motilidad altamente organizada que permite la invasión de lugares recónditos. Un papel fundamental en este proceso degradativo se atribuye a una familia de enzimas dependientes de metal que se asocian con tumores invasivos [77, 78, 81, 82,83].

Las células tumorales se diseminan cuando existe un aumento de la actividad proteolítica que permite invadir los tejidos del huésped y cruzar la matriz

intersticial para llegar a la vascularización. Entre las proteasas las mejores conocidas son las metaloproteinasas de la matriz (MMPS) y el sistema activador del plasminógeno urokinasa (PU) y su receptor (PUR). Las MMPs son una familia de más de 20 proteínas que de manera conjunta degradan todos los componentes conocidos de la matriz extracelular. Su capacidad degradativa permite a las células tumorales migrar por la matriz extracelular (MEC). Cada MMP tiene la habilidad de degradar un tipo particular de proteína de la matriz, implicándose en la invasión tumoral [84]-

Estudios *in vivo* que miden la capacidad de penetración celular sobre una membrana basal reconstituida demuestran que existe una correlación entre la actividad MMP y la invasividad. Cuando aumentan los niveles de MMPs aumenta la invasión, y al contrario [85]. La regulación de MMPs es un complejo proceso, mediado en parte por inhibidores tisulares específicos (TIMP-1 y TIMP-2, mayoritariamente); así como por el factor de crecimiento básico fibroblástico (bFGF) y por interleukina-8 (IL-8). Hace tiempo se pensó que la actividad MMP solamente funcionaba en el proceso metastásico, pero hoy se sabe que dicha actividad funciona en múltiples etapas de la progresión tumoral, incluida la angiogénesis [86,87].

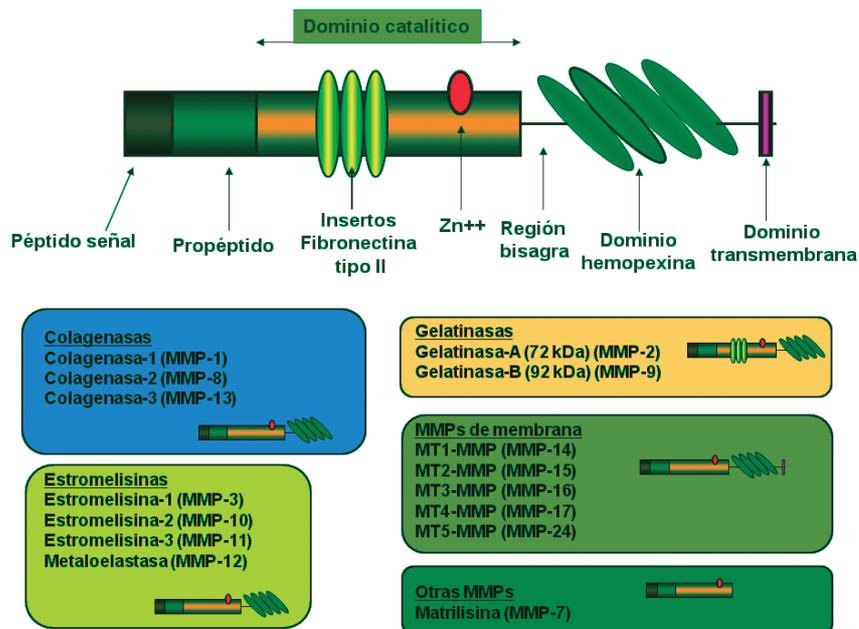


Figura 1. Diferentes tipos de MMPs según su composición molecular.

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) son un grupo importante de endopeptidasas dependientes de zinc que regulan la integridad y la composición de la membrana extracelular, de acuerdo con su capacidad para romper uno o varios de sus componentes. Los miembros de la familia MMP comparten elementos estructurales comunes que incluyen un propeptido N-terminal, que mantiene la latencia en las formas zimogénicas, un lugar catalítico que contiene zinc, y un dominio C-terminal que se conoce como el dominio tipo hemopexina. Las modificaciones de esta estructura de organización básica estructural separan a los miembros de la familia MMP en cinco subgrupos mayores: colagenasas, estromelisininas, matrilisininas, gelatinasas y metaloproteinasas tipo membrana (MT-MMPs) Figura 1. Las gelatinasas contienen una región tipo fibronectina adicional intercalada con el dominio catalítico que se piensa involucrado en la unión con el colágeno.

Las MT-MMPs contienen un único dominio transmembrana que juega un papel en el anclaje del enzima a la membrana plasmática [88, 89]. Dentro del

dominio catalítico hay dos átomos de zinc, uno (el zinc catalítico) se encuentra presente en el sitio activo y está involucrado en la activación enzimática que sucede después de la ruptura de la región del propéptido. Se cree que el otro átomo de zinc juega un papel estructural [90,91]. El dominio tipo hemopexina funciona como un elemento de unión del sustrato y, en el caso de las formas latentes de gelatinasas, también interactúa con los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs), una familia de cuatro proteínas de bajo peso molecular que inhibe de manera eficiente la actividad MMP mediante la unión al dominio catalítico Figura 2.

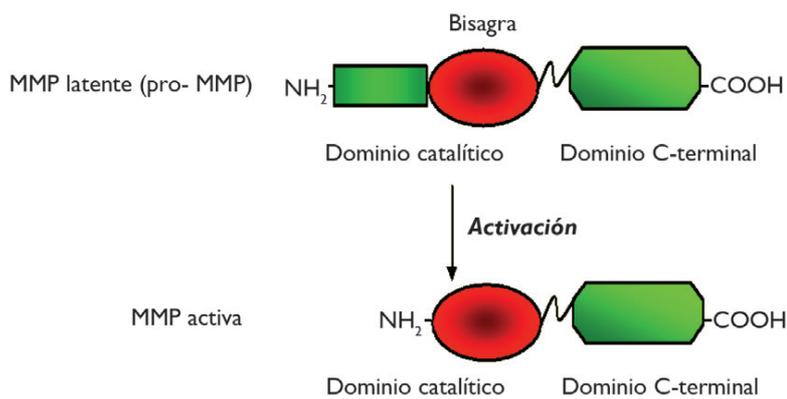


Figura 2 A

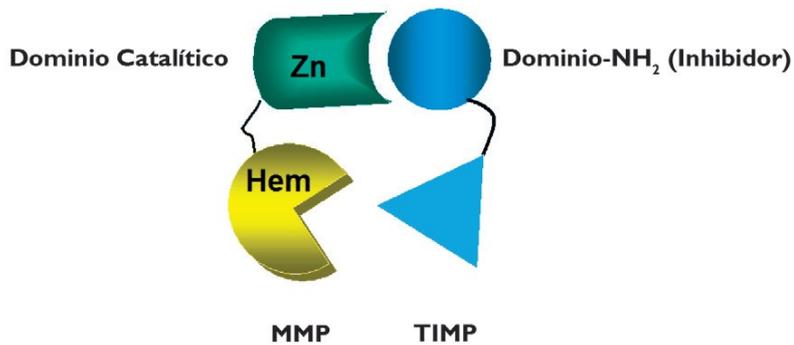


Figura 2 B

Massova et al analizaron la secuencias enteras de los dominios catalítico y de los dominios tipo hemopexina en los 64 miembros de la familia MMP con intención de conocer su evolución, estructura e interacciones con diversos sustratos e inhibidores. Esta investigación dio lugar a 23 agrupamientos o subgrupos con similar composición, llevando a la hipótesis de que la unión de dominios en estas proteínas tuvo lugar en un estado precoz de diversificación, existiendo unas proteínas sencillas de dominio único que sufrieron un proceso de fusión genética que generó los complejos enzimas multidominio [147]. Todos los tipos de MMPs se producen por enzimas latentes o zimógenos, también conocidos como pro-MMPs que requieren ser activados para convertirse en proteolíticamente activos.

De hecho, la activación de pro-MMPs es un paso importante en la regulación de la proteólisis mediada por MMPs. Dos miembros de la familia de MMPs son particularmente importantes en la invasión de las células tumorales y en la angiogénesis, Mr 72.000 (MMP-2 o gelatinasa A) y Mr 92.000 (MMP-9 o gelatinasa B). Las MMPs, inicialmente conocidas como colagenasas tipo IV, debido a su particular propiedad de hidrolizar el colágenos tipo IV de la membrana, que constituye una barrera principal frente a las células invasoras y un paso clave durante la angiogenesis [78,81,92,93]. Como todos los miembros de la familia de MMPs, la actividad de MMP-2 y MMP-9 se regula en diferentes niveles, que incluyen transcripción, secreción, activación e inhibición por TIMPs [94,95].

Grupo	MMP	Nombre	Sustrato
Colagenasas	MMP-1 MMP-8 MMP-13	Colagenasas fibroblástica Colagenasa intersticial Colagenasa de los neutrófilos Colagenasa 3	Colágenos fibrilares tipos III, I, II, VII y X, agreicanos y serpinas Colágenos fibrilares I, III y II, agreicanos Colágeno II
Gelatinasas	MMP-2 MMP-9	Gelatinasa A 72 kDa gelatinasa Colagenasa-4 Colagenasa-5 92 kDa gelatinasa	Colágenos IV, V, VII y X, elastina Colágenos I, IV, V, elastina

Estromelisininas	MMP-3 MMP-10 MMP-11	Estromelisinina-1 Estromelisinina-2 Estromelisinina-3	Fibronectina, colágenos IV, V, IX y X, elastina, laminina y proteoglicano Fibronectina, colágenos III, IV, V, elastina, laminina y proteoglicanos Muy débilmente: laminina y fibronectina
Matrilisininas	MMP-7	Matrilisina PUMT-1 Matrina	Proteoglicanos, laminina, fibronectina, elastina, gelatina
Metaloeelastinas	MMP-12	Metaloeelastasa macrófaga	Elastina, fibronectina, colágeno tipo IV
Metaloproteinasas de membrana	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17 MMP-24 MMP-25	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT4-MMP MT5-MMP MT6-MMP	Colágenos I, II y III, laminina, gelatina, fibronectina y proteoglicanos. ProMMP-2 Forma parte de la actividad proteolítica leucocitaria
Miscelánea	MMP-19 MMP-20 MMP-21 MMP-22 MMP-23 MMP-26 MMP-27 MMP-28	RASI-1 Enamelsina XMMP CMMP CAMMP Endometasa Epilisina	Gelatinas Amelogenina Gelatina tipo I, Vitronectina y colágeno desnaturalizado

**Tabla 4: Clasificación de las MMPs**

### 1.2.2. Metaloproteinasa de la Matriz tipo 2 (MMP-2)

La gelatinasa A o MMP-2, denominada así por su afinidad por el colágeno tipo IV desnaturalizada, con un peso moléculas de 72 y 62 KDa para la proenzima y la enzima activa, respectivamente, presenta una estructura común con otras MMP, formada por un pro-peptido con un dominio catalítico N-terminal, que contiene zinc y un dominio C-terminal tipo hemopexina. A diferencia de otras MMPs, posee un exoreceptor adicional en el dominio catalítico, el cual se denomina Dominio Fijador de Colágeno (Collagen Binding Domain/ CBD), compuesto a su vez por tres repeticiones homólogas tipo fibronectina II. CBD es el dominio principal responsable del reconocimiento del sustrato [96] (colágeno tipo IV o gelatina; de ahí el nombre de gelatinasas).

La MMP-2 se expresa en casi todos los tejidos humanos, sobre todo, en los fibroblastos y las células endoteliales y epiteliales. En condiciones fisiológicas, existe una concentración sérica detectable de la enzima y su

actividad está ligada a procesos homeostáticos. Su actividad está íntimamente regulada por TIMP, en concreto TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. La actividad biológica de la enzima está asociada con una plétora de procesos fisiopatológicos, como enfermedades neoplásicas, cardiovasculares y procesos autoinmunes.

La MMP-2 contribuye en el proceso de carcinogénesis de los tumores uroteliales y de próstata [97], y en la mayoría de los casos, la sobrerregulación de MMP-2 se asocia con peor pronóstico [98]. En las fases iniciales, la MMP-2 es crucial en el desarrollo de un microambiente favorable para el crecimiento de las células tumorales y contribuye a la transición epitelio-mesénquima. La adquisición del fenotipo mesenquimal es un distintivo de las células tumorales, las cuales pierden su morfología tisular específica a favor de un fenotipo desdiferenciado apto para la migración e invasividad [99]. La contribución de MMP-2 a la invasión incluye diferentes aspectos: i) degradación de la membrana basal (colágeno IV, laminina y fibronectina), lo cual permite la migración celular al torrente sanguíneo; ii) liberación de factores bioactivos; y iii) exposición de sitios de adhesión ocultos que conducen a motilidad celular. MMP-2 también activa citocinas, factores de crecimiento, modula el metabolismo de las células tumorales, la resistencia celular a la apoptosis y la angiogénesis.

La MMP-2 también interactúa en procesos no tumorales de índole cardiovascular como la aterosclerosis, el infarto de miocardio y el ictus [100, 101] y enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple [102] y la artritis reumatoide [103].

### **1.2.3. Metaloproteinasa de la Matriz tipo 9 ( MMP-9)**

La gelatinasa B o MMP-9, con un peso molecular de 92, 85 y 82 kDa para la pro-enzima, forma intermedia y enzima activa, respectivamente, posee una estructura homóloga a MMP-2 con la excepción de un dominio de enlace O-glicosilado más largo, lo que confiere una extraordinaria flexibilidad a la

enzima, siendo esta característica su principal distintivo. El dominio catalítico de MMP-2 y MMP-9 poseen una estructura similar, la principal diferencia es la presencia de Asp410, en lugar de Glu en S2 [104]. El dominio fijador de colágeno (CBD), se localiza en la porción terminal del dominio catalítico, pero con una orientación distinta de MMP-2 [105].

Se ha identificado su presencia en diferentes procesos inflamatorios, cardiovasculares, autoinmunes (lupus eritematoso sistémico), enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer), osteoarticulares y neoplasias, entre las que se encuentran el cáncer de vejiga y de próstata. Los niveles séricos de MMP-9 son casi indetectables en condiciones fisiológicas, lo que hace que el valor diagnóstico y pronóstico de cuantificación de la enzima, tenga un valor significativo, por lo tanto, concentraciones elevadas de MMP-9 se asocian generalmente con peor pronóstico de la enfermedad tumoral [106].

Debido a su alta afinidad por el colágeno IV, históricamente se ha identificado como una proteasa degradadora de la membrana basal y estrechamente relacionada con invasión tumoral, aunque también contribuye al control de la división celular, confiriendo resistencia a la apoptosis y como activador de angiogénesis mediante un complejo proceso que incluye la liberación de VEGF [107].

#### **1.2.4. Inhibidor tisular de metaloproteinasas**

La principal función de las MMPs es el crecimiento tisular y su remodelación mediante degradación proteolítica selectiva. Sin embargo, para evitar el recambio sin control de la matriz extracelular, su papel en procesos inflamatorios, así como el crecimiento y la migración celular, la actividad de las MMPs, bajo condiciones fisiológicas, está regulada por inhibidores endógenos. La regulación endógena de las MMPs se realiza en tres niveles, que comprenden la transcripción genética, activación zimógena e inhibición de la actividad enzimática.

Los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (tissue inhibitors of Metaloproteinasas / TIMPs) son inhibidores endógenos naturales específicos, implicados en la remodelación de la matriz extracelular mediada por MMPs, en la remodelación tisular y en el comportamiento celular. En humanos han sido identificado 4 diferentes TIMPs: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4, las cuales comparten aproximadamente un 40% de homología. Todas ellas, presentan dos dominios diferentes, un dominio C-terminal y un dominio N-terminal. La región N-terminal se une al dominio catalítico de las MMPs e inhibe su actividad. La región TIMP C-terminal interacciona con el dominio hemopexina de pro-MMP-2 y pro-MMP-9 para estabilizar la proenzima y bloquearlas.

Las 4 diferentes TIMP tienen un dominio amino terminal que es el responsable de su actividad inhibidora

El incremento de la TIMP-1 se ha asociado con una reducción de la invasión y metástasis, al igual que la TIMP2.

Aunque los TIMPs fueron inicialmente catalogados como inhibidores de las MMPs, esta función constituye solo una parte importante de su actividad, entre otros papeles relevantes, son los encargados de la modulación de la proliferación, migración e invasión celular y están implicados en procesos de angiogénesis y apoptosis [108].

#### **1.2.5. Papel diagnóstico y pronóstico de MMPs y TIMPs en la enfermedad neoplásica y en el cáncer de próstata**

La sobreproducción de MMPs por tumores que interaccionan con los sistemas linfáticos y vasculares puede producir niveles aumentados de MMPs y TIMPs, no sólo en los tejidos sino también en otros fluidos biológicos como la sangre o la orina. Diversos estudios han destacado la existencia de patrones de expresión y sobreexpresión de MMPs y TIMPs, y

las implicaciones potenciales para los pacientes. Estos estudios se han beneficiado de la ventaja que proporcionaban los grandes progresos llevados a cabo en la medicina molecular en las pasadas décadas, que han permitido el desarrollo de importantes herramientas de diagnóstico como RT-PCR, hibridación in situ, inmunohistoquímica y zimografía, por mencionar algunas, que sirven para estudiar la expresión de MMPs en pacientes con cáncer.

El papel de las MMPs y TIMPs han sido puntos clave para la investigación en diversas neoplasias malignas humanas que incluyen mama [109,110] , colon [111], próstata [112], y vejiga [113]. De manera especial en el cáncer vesical las gelatinasas pueden tener un papel dual sobre el crecimiento y la diseminación tumoral. La comprensión de los mecanismos reguladores entre MMPs y TIMPs, podría permitir el desarrollo de inhibidores sintéticos de MMPs que sirvieran como aproximación terapéutica al cáncer, limitando el crecimiento y la diseminación tumoral al romper alguno de los procesos esenciales para la progresión maligna.

#### **1.2.6. Nuevos abordajes terapéuticos con inhibidores sintéticos de MMPs.**

A medida que nuevos estudios corroboran la correlación existente entre la expresión y la activación de MMPs y la progresión del cáncer, numerosos investigadores han dedicado sus esfuerzos a desarrollar nuevos compuestos sintéticos que podrían bloquear o neutralizar la acción de la MMPs. Para tener éxito estos compuestos deben tener ciertas propiedades como la biodisponibilidad, alta solubilidad y baja toxicidad.

La mayoría de los inhibidores de MMPs generados hasta hoy son agentes de amplio espectro, basados en hidroxamato, que tienen como diana a la mayoría de los miembros de la familia de MMPs. Batimastat fue el primero de estos agentes en ser probado con resultados prometedores en modelos animales[114]. No obstante, su falta de biodisponibilidad ha constituido un

freno en su desarrollo. Otros fármacos de segunda generación como Marimastat, con un perfil similar pero con solubilidad mejorada, está siendo estudiada en ensayos en fase III para pacientes con diversas formas de cáncer. Recientemente se ha introducido un inhibidor de MMP-2 de nuevo mecanismo, llamado SB-3CT. Este inhibidor no persigue la estrategia de quelar el metal para inhibir la actividad gelatinasas, sino que a diferencia de los otros inhibidores desarrollados con anterioridad muestra una inhibición irreversible de alta afinidad para MMP-2 [115]. Estos resultados son muy prometedores y sugieren un importante papel para estos nuevos agentes citostáticos antineoplásicos en el futuro.

### **1.3. EXPERIENCIA PREVIA DE NUESTRO GRUPO**

### 1.3.1. Papel de las MMP y TIMP en el cáncer de mama

Las metaloproteinasas de matriz -2 (gelatinasa A) y MMP-9 (gelatinasa B) están relacionadas con la invasión tumoral y la metástasis por su especial capacidad para degradar el colágeno de tipo IV que se encuentra en las membranas basales [116] y para inducir angiogénesis [117]. Vizoso et col [118] demostraron en su estudio que una alta expresión de MMP-9 se correlaciona significativamente con la agresividad tumoral y mal pronóstico en el cáncer de mama coincidiendo con estudios previos [119,120], por otro lado hay estudios que han demostrado que la alta expresión de la MMP-2 en células de carcinoma, ha sido relacionada con sólo unos pocos factores pronósticos inversos [121] o demostrado tener ninguna asociación con parámetros clínicos en cáncer de mama [122,123].

También se ha descrito que a medida que progresa el cáncer de mama, la producción de la MMP-2 aumenta durante las primeras fases, mientras que la activación de MMP-9 se produce durante la etapa posterior [124] lo que podría explicar su diferente impacto clínico en el pronóstico de los tumores de mama invasivos.

La Metaloproteinasa de matriz-1 (colagenasa-1), es la más ubicua de las colagenasas intersticiales que se expresa, es necesaria para la invasión local porque posee la capacidad de degradar eficazmente el colágeno de tipo I - el principal componente del tejido conectivo [125, 117]. Vizoso et col demostraron que la expresión alta de la MMP-1 en los fibroblastos se correlacionaban con la aparición de metástasis, que confirman los resultados de estudios previos que muestran que esta MMP se asocia con una capacidad de metástasis elevada [126,127].

Metaloproteinasa de la matriz -7 (matrilisina 1) es una estromelisinina, que degrada el colágeno de tipo IV, fibronectina y laminina. Existen estudios que demuestran que la MMP-7 es una forma aberrante que se expresa en los tumores de mama humanos, y que la eliminación de MMP-7 se asocia con una baja capacidad de invasión y crecimiento tumoral lento [128]. En 2007

se publicó que la sobreexpresión de la MMP-7 en cáncer de mama (MCF-7) aumenta la invasividad celular y la activación de proMMP-2 y MMP-9 [129]. Sin embargo, el papel potencial de la MMP-7 en el cáncer de mama humano y particularmente en el cáncer de mama clínico, no se ha investigado a fondo.

Los estudios experimentales de Vizoso et al muestran que los altos niveles intratumorales de MMP-7 se asociaron significativamente con varios parámetros indicativos de la agresividad tumoral y vinculados con una alta aparición de metástasis a distancia. También demostraron que la MMP-11 (Stromalysin-3) se expresa preferentemente en las células del estroma peritumoral [130] y que los altos niveles de MMP-11 se asociaron con la progresión tumoral y mal pronóstico [131].

La metaloproteínasa-13 (colagenasa-3) dispone de una amplia especificidad de sustrato cuando se compara con otras MMPs [132]. Además, se cree que desempeñan un papel central en la cascada de activación de MMP, tanto por activar y ser activada por varias otras MMPs (MMP-14, 2, o 3). Nielsen et al han comunicado que la expresión de MMP-13 por miofibroblastos se asoció con eventos microinvasivos, y han propuesto que esta MMP puede jugar un esencial papel durante la transición de carcinoma ductal in situ a carcinoma ductal invasivo de la mama [133].

Vizoso et al encontraron una alta expresión de MMP-13 en los tumores en fase inicial, pero también asociado en los tumores que muestran infiltración y una mayor tasa de metástasis a distancia cuando se expresó la MMP por las células fibroblásticas o por células mononucleares inflamatorias.

Metaloproteínasa de la matriz -14 (MMP de tipo membrana 1, o MT1-MMP) es una metaloproteasa clave implicada en la degradación de matriz extracelular, activa pro-MMP-13 [134] y pro-MMP-2 [135] en la superficie celular, y tiene un papel crucial en la carcinogénesis molecular, el crecimiento de las células tumorales, invasión, y la angiogénesis. Vizoso et al encontraron asociaciones significativas entre la expresión de MMP-14 y

parámetros clinicopatológicos indicativos de la agresividad del tumor. Describiendo la fuerte asociación entre la expresión de MMP-14 por las células del estroma y el mal pronóstico. También muestran una asociación significativa entre TIMP-1, TIMP-2 y varios parámetros indicativos de la agresividad tumoral así como con una alta incidencia de metástasis a distancia están en de acuerdo con hallazgos similares reportados por otros autores [136].

Si TIMPs inhiben MMPs in vivo, es de esperar que los altos niveles de estos inhibidores podrían prevenir la progresión del tumor y por lo tanto sean relacionados con buenos resultados en pacientes con cáncer. Sin embargo, TIMPs son proteínas multifuncionales que, además de su efecto inhibitorio sobre las MMP también demuestran distintas funciones estimuladoras del tumor [137].

Los estudios experimentales han demostrado que los TIMP-3 puede mostrar actividad para inhibir la angiogénesis e inducen la apoptosis [138]. También se ha publicado que los niveles altos de TIMP-3 ARNm se asocian con un buen pronóstico en cáncer de mama [139]. Del mismo modo, Span et al [140] han observado que los altos niveles de TIMP-3 predijeron un periodo más largo de supervivencia libre de recaída en pacientes tratadas con tamoxifeno. Todos esos hallazgos sugieren que TIMP-3 está implicada en las vías específicas de apoptosis inducida por tamoxifeno.

Vizoso et col [117] muestran una significativa mayor expresión de TIMP-3 en los tumores ER positivos, de hecho altos niveles TIMP-3 ARNm se asocian con un buen pronóstico en cáncer de mama [139]. Del mismo modo, Span et al [140] han informado de que los altos niveles de TIMP-3 predijeron un periodo más largo la supervivencia libre de recaída en pacientes tratadas con tamoxifeno. Todos esos hallazgos sugieren que TIMP-3 está implicada en las vías específicas de apoptosis inducida por tamoxifeno. Vizoso et col [117] muestran una significativa mayor expresión de TIMP-3 en los tumores ER-positivos, de conformidad acumulada que tanto los cambios en el comportamiento del estroma y la interacción entre las células tumorales y las

células estromales están íntimamente vinculado con los procesos de tumorigénesis, invasión tumoral, y metástasis [124, 141]. Se ha demostrado que varios tipos de células malignas (por ejemplo, de mama y de colon) reclutan activamente fibroblastos en los tumores, lo que lleva a un aumento en la extensión de la extracelular degradación de la matriz [142]. Existen publicaciones que muestran que la incubación de células de cáncer de mama con monocitos o macrófagos induce una diafonía que se traduce, en un aumento / expresión de factores implicados en la invasividad de las células del cáncer y en una modificación de la función de monocitos contra las células cancerosas[143].

Vizoso et col [117] plantea la hipótesis de que los tumores secretan factores capaces de provocar una respuesta de cicatrización de la reparación asociada con el tumor y el tumor infiltrante estimula células inflamatorias, esta respuesta estimula la progresión del tumor [144]; o que es el tejido del huésped, con una respuesta redundante de factores bioquímicos a las células cancerosas, el que induce el crecimiento tumoral. Vizoso et col demuestran una variabilidad biológica en el comportamiento de estas células estromales con respecto a la expresión de MMPs y TIMPs, que es de importancia clínica. También muestran que la expresión de MMPs y algunos TIMPs tiene un valor potencial como predictor de metástasis distantes a excepción de la MMP-7 y MMP-14, sin afectación ganglionar.

Por el contrario, Vizoso et col [117] encontraron que la expresión global de TIMP-2 y MMP-13 implica una correlación negativa con los ganglios linfáticos, por lo tanto los mecanismos biológicos implicados en la difusión por los vasos sanguíneos y linfáticos dependen de diferentes procesos tumorales.

Vizoso et col [117] demuestran la importancia de las MMPs y TIMPs en la progresión del cáncer de mama, y valorar su presencia con el fin de llegar a una estimación pronóstica más precisa en el carcinoma ductal invasivo de mama.

### **1.3.2. Metaloproteinasas en cáncer de próstata**

La expresión de MMP-2 se asoció negativamente con alto grado del tumor. Con respecto a los fibroblastos del estroma, TIMP-3 de expresión se asoció positivamente con el grado histológico. MMP-7 de expresión se asoció negativamente con los niveles séricos pretratamiento de PSA, mientras que la MMP-13 se asoció positivamente con los niveles más elevados de antígeno. TIMP-2 de expresión por las células inflamatorias mononucleares correlacionaron significativamente y negativamente con el grado del tumor.

La expresión de TIMP-3 por los fibroblastos se asoció con una puntuación de Gleason más alto. Un aumento de la expresión de MMP-13 por los fibroblastos se asoció con un mayor nivel preoperatorio de PSA. En contraste, la expresión de MMP-2 por el tumor, así como TIMP-2 expresión por las células inflamatorias peritumoral se asoció con características de carcinoma de próstata menos agresivos [145].

La expresión de la MMP-13 por las células tumorales se asocio de forma significativa con una alta tasa de recurrencia bioquímica en el cáncer de próstata. [146] La MMP-13 se ha detectado que se expresa en diferentes líneas celulares de cáncer de próstata, tejido de cáncer de próstata y hiperplasia benigna de próstata [147]. Se ha demostrado también que las concentraciones plasmáticas de MMP-13 eran altas en pacientes con metástasis de cáncer de próstata, y en estos pacientes disminuyeron notablemente después del comienzo del tratamiento.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

El cáncer de próstata representa actualmente un importante problema de salud, dada su incidencia y la inexistencia de marcadores fiables, tanto para su diagnóstico como para estimar su evolución. La realización de biopsias diagnósticas se basa en el tacto rectal y el PSA, pruebas que han mostrado bajo valor predictivo positivo de la presencia de una neoplasia prostática, lo que obliga a la repetición frecuente de las mismas. Por ello en los últimos años se han introducido tests adicionales como PCA3 o 4K-Score que buscan delimitar mejor qué pacientes pueden requerir una nueva biopsia ante unos hallazgos previamente negativos, no existiendo tampoco marcadores histológicos que determinen un alto grado de sospecha de la presencia de un tumor en estos casos. Por otro lado, aunque se va conociendo mejor la evolución de los tumores de próstata aparentemente localizados en pacientes sometidos a un tratamiento radical como la prostatectomía radical, en un número significativo de casos se objetiva una recidiva bioquímica (PSA) o clínica (recidiva local o a distancia) tras dichos tratamientos.

La identificación de los pacientes con prostatectomía radical cuya enfermedad va a evolucionar se ha basado en nomogramas elaborados a partir de factores clínicos que son difíciles de aplicar y que no proporcionan una fiabilidad precisa en la identificación de estos pacientes. Esta carencia pone de manifiesto la necesidad de identificar marcadores que nos permitan conocer qué neoplasias van a evolucionar y cómo. Las nuevas técnicas de laboratorio de análisis molecular permiten identificar y estudiar múltiples factores moleculares rápidamente y con un bajo coste.

Recientes publicaciones han demostrado que las metaloproteinasas juegan un papel importante en la agresividad y evolución de diferentes tumores en los humanos. Existe evidencia que los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs) poseen una actividad multifactorial sobre la inhibición de la apoptosis y en la inducción de la proliferación tumoral.

La influencia de los factores estromales en el origen y evolución de diferentes tumores, se ha evidenciado por diferentes estudios clínicos y

experimentales, además pueden estar más involucrados en la producción y progresión de las metástasis que los detectados en las propias células tumorales. Por ello, la gran mayoría de las piezas quirúrgicas de próstata (biopsia de próstata, muestras de resección transuretral o muestras de prostatectomía radical) muestran algunas evidencias de inflamación prostática con distintos grados. La identificación en la zona peritumoral de un fenotipo de células mononucleares inflamatorias o de fibroblastos con una expresión de MMPs y TIMPs característica ha sido identificada en otros tumores como el de mama y tiene gran interés clínico al permitir conocer de forma precoz la evolución agresiva de un tumor, así como en el futuro el desarrollo de dianas terapéuticas específicas.

## **2.2. OBJETIVOS PROPUESTOS**

Por todo lo anterior y empleando una metodología basada en micromatrices tisulares, ya bien establecida a partir de diversos estudios en cáncer de mama que han permitido el desarrollo de modelos predictivos en este tumor, en el presente trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

- Determinar la expresión de metaloproteinasas 1, 2, 7, 9, 11, 13, 14 y de sus inhibidores tisulares 1, 2 y 3 en células mononucleares inflamatorias de piezas de prostatectomía radical en pacientes con cáncer de próstata, neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e hiperplasia benigna de próstata (HBP).
- Comparar las expresiones de dichas MMPs y TIMPs en células inflamatorias mononucleares del estroma prostático procedente de muestras de neoplasia prostática, PIN de alto grado e HBP.
- Relacionar las expresiones de las MMPs y los TIMPs en células mononucleares inflamatorias peritumorales de pacientes con cáncer de próstata con las características clínico patológicas de estos tumores.

- 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 la MMPs y sus inhibidores en células inflamatorias peritumorales.
- Buscar un fenotipo en las células inflamatorias peritumorales, en relación con las MMP2 y los TIMPs citados con diferentes implicaciones pronósticas.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1. PACIENTES Y TIPOS DE MUESTRAS**

Estudio retrospectivo y ciego respecto a las determinaciones histológicas de los marcadores. Se seleccionaron 133 casos con adenocarcinoma de próstata localizados clínicamente, 20 con PIN y 50 con HBP.

Se incluyeron tres grupos de pacientes en el presente estudio:

A) Grupo 1: pacientes con cáncer de próstata. Este grupo estaba comprendido por pacientes con diagnóstico confirmado histológicamente de cáncer de próstata, entre 1990 y 2001. Se seleccionó este grupo de acuerdo con los siguientes criterios de selección:

- Carcinoma invasivo de próstata.
- Un periodo mínimo de cinco años de seguimiento clínico en los pacientes sin recurrencia tumoral.

Se tuvieron en cuenta, además, los siguientes criterios de exclusión:

- Enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico inicial.
- Historia previa de haber padecido algún tipo de tumor maligno.
- Estar recibiendo algún tipo de terapia neoadyuvante.
- Desarrollo de un segundo tumor primario durante el periodo de seguimiento clínico.
- Ausencia de suficiente tejido tumoral en el bloque de parafina de cara a la elaboración de mallas de tejido.

B) Grupo 2: este grupo consistió en 20 pacientes con diagnóstico histológicamente confirmado de PIN.

C) Grupo 3: este grupo consistió en 50 pacientes intervenidos quirúrgicamente de patología prostática benigna y de los que se dispuso de las piezas quirúrgicas.

### **3.2. PROCESO DIAGNOSTICO, DE TRATAMIENTO EN NUESTRO MEDIO**

Los pacientes eran seleccionados en la consulta ambulatoria por sintomatología relacionada con HBP o por controles rutinarios de PSA. La indicación de biopsia prostática estaba basada en las guías europeas de cáncer de próstata [149], cuando el valor de PSA se encontraba en valores superiores a 3.5 ng/ml, según el valor de referencia del laboratorio de referencia, o con tacto rectal sospechoso. La biopsia prostática se realizó dirigida por eco transrectal tomándose al menos seis cilindros en total distribuidos mapeando la próstata.

Cuando la biopsia fue positiva para adenocarcinoma de próstata, se indicó prostatectomía radical en aquellos que se encontraban en un estadio de la enfermedad cT2 o menor, los que por presentar un PSA < 20 ng/ml o por pruebas de imagen (TC, gammagrafía ósea.) no se sospechase enfermedad ganglionar ni metastásica.

En los pacientes que fueron candidatos a prostatectomía radical ésta 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 los vasos iliacos 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.

Los tumores se estadificaron de acuerdo con los criterios del *American Joint Committee on Cancer Staging (AJCCS)* [150]. El grado histológico fue establecido según los criterios de Gleason [45]. Los valores séricos del PSA fueron determinados, preoperatoriamente y postoperatoriamente, utilizando

el test “Elecys” *immune-assay* (Roche Diagnostic GMBH, Mannheim, Germany).

En todos los casos se recogieron los datos de filiación del paciente (nombre, edad, número de historia clínica, número de la biopsia) y se evaluaron los factores pronósticos tradicionales pre tratamiento (estadio clínico, PSA pre tratamiento, Gleason de la biopsia y número de cilindros afectados), parámetros de cada paciente (tacto rectal y volumen prostático), la fecha de realización de la biopsia y si esta fue única o múltiple. También se tuvo en cuenta el índice de PSA libre/PSA total en aquellos que presentasen un PSA menor de 10 ng/ml, se diferenció el patrón de Gleason primario del secundario, así como la localización de las biopsias positivas, la 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*. También los casos que tenían TC o gammagrafía ósea previa al tratamiento se notificaron.

Una vez realizada la prostatectomía radical de la cual se recogieron la fecha y la presencia o no de complicaciones postoperatorias, se analizaron las piezas reconociendo en cada caso el pT de la pieza, el patrón de Gleason de la pieza así como el valor primario y la presencia de PIN, invasión perineural o de las vesículas seminales, bordes afectados y la afectación ganglionar patológica en caso de que existiese.

En el seguimiento se estudió la aparición de recidiva, considerada cuando el PSA ascendía en dos determinaciones consecutivas por encima de 0.2 ng/ml. Se realizó la primera determinación de PSA a los tres meses de la cirugía y posteriormente se controlaba el valor de la proteína cada tres meses. La recidiva se produjo en 47 casos. Se registró, el tiempo hasta la recidiva, el tipo de recidiva (local o a distancia), el PSA, la presencia de masa local, localización y número de las metástasis. También qué tratamiento se ofreció y la progresión o no progresión posterior a la recidiva, así como el estado actual del paciente y el PSA.

### 3.3. METODOLOGÍA DE LABORATORIO

arc24638 29/9/15 11:23

Eliminado: EN EL

#### 3.3.1. Selección de bloques de parafina

Las mallas de tejido se realizaron seleccionando zonas del área central del tumor primario con objeto de evaluar el estroma intratumoral, y otras del área periférica para valorar el estroma de la frontera tumoral y el estroma peritumoral. También se estudiaron áreas inflamatorias en los pacientes sometidos a adenomectomía, sin tumor maligno

#### 3.3.2. Elaboración de las mallas de tejido

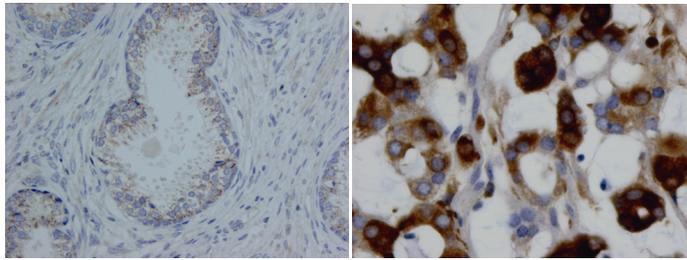
Las muestras tumorales que se utilizaron en este estudio fueron fijadas de forma rutinaria durante 17 horas en formaldehído (al 10%) y posteriormente embebidas en bloques de parafina y almacenadas en los laboratorios de anatomía patológica.

Se seleccionaron cuatro cilindros del tumor primario, dos de esos cilindros correspondieron al área central del tumor y otros dos a la frontera tumoral. La frontera invasiva fue definida como el área de avance tumoral, que corresponde a 2 mm de margen rodeando al tumor y conteniendo células neoplásicas. Cada una de esas áreas tisulares se identificó marcando directamente con un rotulador permanente las laminillas teñidas con hematoxilina-eosina.

Todas esas áreas eran representativas del centro del tumor, de la frontera tumoral y del estroma peritumoral, respectivamente. Los bloques de mallas de tejidos ("tissue arrays") se obtuvieron puncionando el bloque tumoral donante con una aguja de un calibre de 1,5 mm en el área previamente seleccionada e insertando el cilindro correspondiente en el bloque receptor compuesto en un principio sólo de parafina.

Toda esta maniobra se hizo con la ayuda de un instrumento específico (Manual Tissue Arrayer MTA I de la casa Beecham). Se estableció un orden riguroso de los cilindros en el bloque receptor que quedó anotado en la plantilla correspondiente para la interpretación de los resultados. Se seleccionaron siempre dos cilindros de cada área representativa, procurando siempre no incluir zonas de necrosis tumoral.

De los bloques se procedió a obtener secciones de 5  $\mu\text{m}$  de espesor mediante un microtomo (Leika Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), transfiriéndose cada una de dichas muestras a su correspondiente portaobjetos de superficie adherente. Una de dichas secciones se empleó para realizar una tinción con hematoxilina-eosina para comprobar que contenía las muestras representativas de los diferentes tumores.



**Figura 3. Ejemplos de expresión de MMP-1 en patología prostática benigna y en cáncer de próstata (400x).**

### 3.3.3. Análisis inmuno histoquímico

Sobre las secciones tisulares fijadas con formol al 10% y sumergidas en parafina, se realizó el estudio inmuno histoquímico usando un inmuno teñidor automático (TechMate TM50 autostainer, Dako, Glostrup, Denmark) con objeto de evaluar la expresión de las proteínas y su localización morfológica en el ámbito del tejido tumoral.

Las secciones de tejido se des parafinaron en xileno y se rehidrataron con concentraciones decrecientes de alcohol etílico (100%, 96%, 80%, 70%, luego agua). Para aumentar la recuperación de los antígenos de interés las secciones fueron calentadas a 95°C mediante un aparato microondas *H2800 Microwave Processor* (EBSciences East Granby, CT, USA) en un buffer de citrato (Target Retrieval Solution; Dako) a 99°C durante 16 minutos. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó incubando las muestras en una solución específicamente diseñada para ello (Dako) durante 5 minutos.

Se utilizarán anticuerpos comerciales contra:

- Proteínas relacionadas con la invasión y metástasis: colagenasa intersticial (MMP-1), colagenasa neutrofílica (MMP-8), colagenasa-3 (MMP-13), gelatinasa A (MMP-2), gelatinasa B (MMP-9), matrilisina (MMP-7), estromalisina-3 (MMP-11), metaloproteinasa de membrana tipo 1 (MT1-MMP), TIMP-1 y TIMP-2.
- Antígenos marcadores de tipo celular para linfocitos T (CD 3, CD 45Ro, CD 4, CD 8) , células dendríticas (CD1a) y macrófagos (CD68 ) todos ellos de la casa DAKO, Glostrup, Dinamarca.
- Adicionalmente determinamos citoquinas: interferón- $\gamma$ , interleukina-2, -6, -10; así como TGF- $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , (Abcam, Cambridge, UK).

Las diluciones utilizadas fueron: 1/50 para MMP-2,-7 y TIMP-2; 1/100 para MMP-9, 13, TIMP-1 y -3; y 1/200 para MMP-1 y -11. El control negativo se realizó con suero diluido con la misma concentración de Ig G murina que el anticuerpo primario. Todas las diluciones fueron realizadas en un anticuerpo diluyente (Dako) e incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente. En estudios previos se confirmó la presencia de las proteínas evaluadas por

análisis de Western Blot, una simple banda de la masa molecular esperada fue observada para cada proteína.[151,152]

Como sistema de tinción para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo se utilizó un kit de Dako, que incorpora diaminobencidina como cromógeno. Las secciones fueron contrastadas con hematoxilina, deshidratadas con etanol y montadas definitivamente.

#### **3.3.4. Análisis de las tinciones inmuno histoquímicas**

Para las determinaciones inmunohistoquímicas, se estableció un orden combinado de las diferentes determinaciones de factores de acuerdo con los distintos cortes histológicos de cada muestra tisular, de tal forma que ello nos permitía evaluar las posibles asociaciones de los distintos factores en cada sub-población de células. Para las técnicas de inmunotinción se utilizó un inmunteñidor automático (DAKO AUTOSTAINER). Se trata de un sistema automático de tinción inmunohistoquímica con software incorporado, que permite la realización de varias tinciones simultáneas hasta un máximo de 48 portas. Se trata, además, de un sistema horizontal, con lo que se evitan problemas de difusión de reactivos y está abierto a todo tipo de anticuerpos y protocolos de tinción.

Las secciones fueron cortadas a 5 micras con el apoyo de un microtomo automatizado HM-355S de la casa MICROM. Los anticuerpos primarios comerciales fueron de las casas especificadas en el apartado anterior. Se empleó como sistema de detección el método del polímero conjugado (En Vision™ de la casa DAKO). En algunos casos se realizó recuperación antigénica con calor usando un procesador ultrarrápido de tejidos con un sistema de microondas (H2800 Microwave Processor, EBSciences, East Granby, Connecticut, USA).

Se determinó para cada preparación que se estudiara la localización de la tinción inmunohistoquímica, el porcentaje de células teñidas y la intensidad de la tinción. El análisis fue semicuantitativo y se contó con la ayuda de un

sistema de análisis de imagen (análisis-AUTO software de la casa Soft imaging system, Münter, Alemania), incorporado a un microscopio de investigación Olympus BX51 y a un sistema DP12 de captación de imágenes igualmente de la casa Olympus.

Para el análisis, cada sección tumoral estaba teñida con el correspondiente anticuerpo según el método explicado previamente y contrastada con hematoxilina. Cada tinción tenía una diferente densidad óptica que captaba el programa. Cada cilindro era analizado con un aumento de 400x en dos áreas diferentes, seleccionando el programa informático el área marcada por el anticuerpo que presenta una mayor densidad óptica y quedando teñida de rojo mientras que el área no marcada (fondo) y sólo contrastada con hematoxilina, de menor densidad óptica, quedaba teñida de azul.

Cada campo medido tenía un porcentaje resultante de dividir el área teñida entre el área no teñida y se obtuvo una media final entre las dos áreas analizadas en cada cilindro. Para evaluar la intensidad de la tinción se usó una puntuación con un rango de 0 a 3, donde 0 corresponde a no tinción, 1 tinción débil, 2, tinción moderada y 3 tinción intensa. Este valor de la intensidad se multiplicó por el porcentaje obtenido con el programa informático para darnos una puntuación final de 0 a 300 para cada cilindro. Como cada tumor tiene dos cilindros seleccionados en una determinada área analizada se hizo la media entre ambos. En caso de que uno de los cilindros no fuera valorable se tomo como base la puntuación obtenida en el otro cilindro.

La evaluación de la tinción inmunohistoquímica global estuvo basada sobre la tinción de áreas correspondientes tanto a las células tumorales como a las células estromales. No obstante, en el presente estudio también evaluamos la tinción inmunohistoquímica para cada uno de los principales tipos celulares: células tumorales, fibroblastos y células mononucleares inflamatorias (MICs). Nosotros distinguimos las células estromales de las células neoplásicas al ser éstas últimas de mayor tamaño. Además, los fibroblastos son células alargadas, mientras que las CMI's son células

redondas. Por otra parte, mientras que las células neoplásicas están dispuestas formando un patrón acinar o trabecular, las células estromales están dispersas. Se utilizaron marcadores específicos para distinguir las células mononucleares inflamatorias de las células tumorales y los fibroblastos.

### **3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

#### **3.4.1. Estadística descriptiva**

Se registraron datos de los pacientes, como: la edad, la fecha de intervención y niveles séricos preoperatorios y postoperatorios de PSA. Los datos de los tumores incluyeron: localización tumoral y tamaño tumoral, estado de afectación ganglionar ( $n^{\circ}$  total de ganglios aislados/ $n^{\circ}$  total de ganglios afectos), grado y tipo histológicos, necrosis, invasión vascular, linfática y neural, infiltrado linfoplasmocitario, y la presencia o no de focos tumorales múltiples (multicéntricos y/ multifocales).

Se obtuvieron datos relativos al tratamiento y seguimiento clínico. En éste último tipo de datos se registró la recurrencia bioquímica (elevaciones séricas posoperatorias de los niveles de PSA), la recurrencia clínica (locorregional o a distancia), y los fallecimientos, diferenciando si fueron o no relacionados con la progresión tumoral.

Se estudiaron las expresiones de la MMPs y sus inhibidores en células inflamatorias peritumorales, señalando una mediana de la puntuación de cada marcador. Las tinciones inmuno histoquímicas fueron analizadas con el apoyo de un sistema de análisis de imagen digital, tal como se señaló con anterioridad. Se analizó la posible relación entre todos los parámetros del estudio y se aplicaron análisis estadísticos paramétricos o, en su caso, no paramétricos, estudios de supervivencia y análisis multivariante.

Las variables cuantitativas se expresan como media  $\pm$  DE(desviación estándar) o bien como mediana (percentil 50) en los casos pertinentes (tiempo de supervivencia).

Se utilizó el test de la t de Student para comparar las medias de dos categorías dentro de una misma variable dependiente y el análisis de la varianza (razón F) para comparar más de dos medias. Las variables cualitativas se expresan como frecuencias y porcentajes. Para conocer la existencia de asociación entre variables realizamos tablas de contingencia y la prueba de Chi<sup>2</sup> de Pearson. Se calculó la significación para este estadístico, así como los riesgos relativos entre cada grupo (grado de asociación) cuando se demostró asociación estadística entre ellos.

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.

#### **3.4.2. Análisis de supervivencia (Método de Kaplan-Meier)**

El análisis de supervivencia (tiempo libre de enfermedad) se realizó mediante el método de Kaplan-Meier, lo cual permite su representación gráfica. Posteriormente, se empleó la prueba del rango logarítmico (log-rank), comparando la forma de las curvas de supervivencia y evaluando así el efecto de cada uno de los factores pronósticos sobre el tiempo libre de enfermedad. Finalmente, se realizó un estudio multivariante de Cox para conocer la influencia de estas variables en la evolución de la enfermedad.

Además, utilizamos el “análisis bidimensional de agregados jerárquico” con el programa “Cluster 3.0” (Universidad de Stanford) para los identificar los diferentes fenotipos de expresión de los factores en los diferentes tipos celulares del tumor primario.

---

#### **4. RESULTADOS**

Se realizaron más de 2.600 determinaciones en muestras de cáncer de 133 pacientes con carcinoma de próstata localizado sometidos a prostatectomía radical (47 con y 86 sin recidiva bioquímica). Las características de los

pacientes y los tumores se presentan en la Tabla 5. La edad de los pacientes osciló entre 44 y 79 años (media, 65,34 ± 6:41 años).

Los valores preoperatorios del PSA variaron de 3,9 a 31 ng/ml (media, 9,19 ± 5,84). Las muestras según la puntuación de Gleason se agruparon en 4 o menos, de 5 a 6 y 7 a 10. Se distribuyeron de la siguiente manera: GS 2-4, 18 (13,5%); GS 5-6 67 (50,4%); GS 7-10 48 (36,1%).

El estadio anatomopatológico se distribuyó de la siguiente manera: T2 localizado, 106 (79,7%) y localmente avanzado T3-4, 27 (20,3%).

Las estimaciones de la probabilidad de permanecer libre de recurrencia se calcularon utilizando el método de Kaplan-Meier. Se utilizó la prueba de rangos logarítmicos para comparar las diferencias en la recurrencia en subgrupos. La recidiva bioquímica o clínica se constató en 47 de los 133 pacientes estudiados. La mediana del tiempo de seguimiento de todos los pacientes con cáncer de próstata fue de 62 meses. La mediana de tiempo hasta la recurrencia de los pacientes fue de 46 meses (rango 1-129).

Cuarenta y siete pacientes (35,3%) experimentaron progresión bioquímica (PSA > 0,2 ng/ml) con metástasis clínicas en 6 pacientes (12,7% de los tumores recurrentes). El tratamiento secundario fue instituido a discreción del médico. La radioterapia postoperatoria se administró a 6 pacientes y la terapia de privación de andrógenos (castración química con la hormona luteinizante liberadora de agonistas de la hormona, antiandrógenos, o una combinación de los mismos) se le administró a 34 pacientes (en 8 casos en tratamiento adyuvante).

También se analizó la expresión de todas estas proteínas en 20 pacientes con PIN y en 50 con HBP.

	Valores	N ( %)
--	---------	--------

<b>Edad</b>	≤ 65	80 (60.1)
<b>Años</b>	>65	53 (39.9)
<b>Estado Patológico</b>	<b>T 2</b>	<b>106 (79.7)</b>
	<b>T3-4</b>	<b>27 (20.3)</b>
<b>Puntuación Gleason</b>	2-4	18 (13.5)
	5-6	67 (50.4)
	7-10	48 (36.1)
<b>PSA Preoperatorio (ng/ml)</b>	≤ 10	<b>93 (69.9)</b>
	> 10	<b>40 (30.1)</b>

**Tabla 5: Características de los pacientes en nuestra serie**

#### **4.1 EXPRESIÓN DE LAS MMP Y TIMP EN LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS MONONUCLEARES EN CP, PIN y HBP..**

En primer lugar, se compararon las expresiones globales de MMP y TIMP en carcinomas de próstata con PIN y HBP (Tabla 6).

arc24638 29/9/15 11:24  
Eliminado:

<b>FACTOR</b>	<b>Número de casos positivos (porcentaje)</b>			<b>Valor de P</b>
	<b>PIN</b>	<b>HBP</b>	<b>CP</b>	

MMP-1	5 (25%)	15 (30%)	123 (92.5%)	< 0.001
MMP-2	4 (20%)	8 (16%)	81 (60.9%)	< 0.001
MMP-7	17 (85%)	35 (70%)	107 (80.5%)	<b>0.232</b>
MMP-9	2 (10%)	3 (6%)	90 (67.7%)	< 0.001
MMP-11	11 (55%)	20 (40%)	123 (92.5%)	< 0.001
MMP-13	9 (45%)	6 (12%)	93 (69.9%)	< 0.001
MMP-14	2 (10%)	29 (58%)	82 (61.7%)	< 0.001
TIMP-1	6 (30%)	14 (28%)	95 (71.4%)	< 0.001
TIMP-2	6 (30%)	14 (28%)	95 (71.4%)	< 0.001
TIMP-3	11 (55%)	29 (58%)	100 (75.2%)	0.03

**Tabla 6. Expresión global de las metaloproteinasas y sus inhibidores en 20 PIN, 50 HBP, y en 133 carcinoma de próstata.**

Sólo la expresión de MMP-7 no muestra diferencia significativa entre el cáncer de próstata y patologías benignas.

Encontramos una gran variabilidad de la expresión de las metaloproteinasas y sus inhibidores en las muestras de carcinoma de próstata.

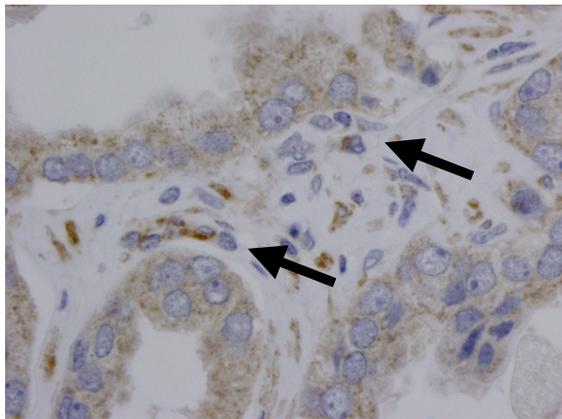
FACTOR	VALORES
	[Mediana (rango)]
MMP-1	104.5 (0-245.1)

MMP-2	42.7 (0-239.6)
MMP-7	52.75 (0-235.56)
MMP-9	39.33 (0-123.9)
MMP-11	111.5 (0-257.53)
MMP-13	42.2 (0-151.7)
MMP-14	32.9 (0-290)
TIMP-1	33.9 (0-120.8)
TIMP-2	52.16 (0-238.8)
TIMP-3	43.35 (0-238.76)

**Tabla 7. Valores de metaloproteinasas y sus inhibidores en 133 carcinomas de próstata.**

Encontramos gran variabilidad de la expresión de MMPs o TIMPs con respecto a su expresión por las células tumorales (CT) o por las células inflamatorias mononucleares (MIC).

El porcentaje de inmunotinción fue mayor en las células tumorales para todas las proteínas estudiadas ya fueran MMPs o TIMPs (tabla 8). En las células inflamatorias mononucleares peritumorales la MMP que presentó una mayor intensidad de tinción globalmente fue la MMP1 (figura 4).



**Figura 4. Ejemplo de TIMP-2 en células inflamatorias mononucleares (flechas negras) (400x).**

<b>FACTOR</b>	<b>Células Tumorales</b>	<b>Células inflamatorias mononucleares</b>
MMP-1	123 (92.5%)	76 (57.1%)
MMP-2	80 (60.2%)	11 (8.3%)
MMP-7	106 (79.7%)	21 (15.8%)
MMP-9	90 (67.7%)	9 (6.8%)
MMP-11	122 (91.7%)	56 (42.1%)
MMP-13	92 (69.2%)	49 (36.8%)
MMP-14	82 (61.7%)	24 (18%)
TIMP-1	95 (71.4%)	43 (32.3%)
TIMP-2	81 (60.9%)	39 (29.3%)
TIMP-3	97 (72.9%)	26 (19.5%)

**Tabla 8: Expresión de MMPs y TIMPs en los distintos tipos celulares del cáncer de próstata. Los datos están representados como número de casos (porcentaje de expresión).**

#### 4.2 ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE MMPS Y TIMPS POR LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS MONONUCLEARES EN PATOLOGÍA PROSTÁTICA BENIGNA Y CÁNCER DE PRÓSTATA.

Con respecto a la expresión de MMPs y TIMPs por MIC, encontramos diferencias en la expresión de algunas MMPs y TIMPs entre próstatas con patología benigna y carcinomas de próstata (Tabla 9).

Por lo tanto, las expresiones de MMP-1, 2, 11 y 13, TIMP-1, 2 y 3 por MIC se mostraron en un mayor porcentaje de casos en los carcinomas de próstata (58,5%) que en PIN o en HBP. Sin embargo, encontramos diferencias no significativas en la expresión de MIC para MMP-7, 9 y 14.

FACTOR	MIC			P
	PIN	HBP	CP	
MMP-1	0 (0%)	3 (6%)	76 (57.1%)	P < 0.001
MMP-2	0(0%)	0 (0%)	11 (8.3%)	P: 0.047
MMP-7	2(10%)	5 (10%)	21 (15.8%)	<b>P: 0.524</b>
MMP-9	0 (0%)	0 (0%)	9 (6.8%)	<b>P: 0.084</b>
MMP-11	1 (5%)	1 (2%)	56 (42.1%)	P < 0.001
MMP-13	2 (10%)	2 (4%)	49 (36.8%)	P < 0.001
MMP-14	1(5%)	6 (12%)	24 (18%)	<b>P: 0.242</b>
TIMP-1	0 (0%)	3 (6%)	43(32.3%)	P < 0.001
TIMP-2	0(0%)	0 (0%)	39 (29.3%)	P < 0.001
TIMP-3	0 (0%)	1 (2%)	26 (19.5%)	P: 0.001

**Tabla 9.** Estudio comparativo de la expresión de MMPs y TIMPs por las células mononucleares inflamatorias en patología benigna y

**cáncer de próstata.** En cada celda aparece el número de casos y entre paréntesis el porcentaje de expresión.

|

#### 4.3 RELACIÓN ENTRE LAS EXPRESIONES DE LAS MMPS Y TIMPS EN CÉLULAS MONONUCLEARES INFLAMATORIAS Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICO PATOLÓGICAS EN PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA

Se analizó la posible relación entre la expresión de MMPs y TIMPs por los diferentes tipos celulares y las características clínico-patológicas de los carcinomas de próstata (células tumorales o células del estroma intratumorales). Nuestros datos demuestran varias asociaciones en función de los tipos celulares que expresan las proteínas (Tabla 10).

Factor	Células tumorales Puntuación de Gleason			Total	P-Value
	2-4	5-6	7-10		
MMP-2 (-)	7 (13.2%)	20 (37.7%)	26 (19.1%)	53 (100%)	0.032
MMP-2 (+)	11 (13.8%)	<b>47 (58.7%)</b>	22 (27.5%)	80 (100%)	
MMP-7 (-)	8 (29.7%)	12 (44.4%)	7 (25.9%)	27 (100%)	0.021
MMP-7 (+)	10 (9.4%)	<b>55 (51.9%)</b>	<b>41 (38.7%)</b>	106 (100%)	
MMP-13 (-)	10 (24.4%)	19 (46.3%)	12 (29.3%)	41 (100%)	0.047
MMP-13 (+)	8 (8.7%)	<b>48 (52.2%)</b>	<b>36 (39.1%)</b>	92 (100%)	
TIMP-1 (-)	11 (28.9%)	13 (34.3%)	14 (36.8%)	38 (100%)	0.018
TIMP-1 (+)	7 (7.4%)	54 (56.8%)	<b>34 (35.8%)</b>	95 (100%)	

**Tabla 10.** Relación entre la expresión de MMPs y TIMPs por las células tumorales y el grado histológico del tumor. Los datos están representados como número de casos (porcentaje de expresión).

Con respecto a la expresión por las células tumorales, se encontró que la expresión de MMP-2 fue negativa y significativamente asociada con tumor de alto grado; mientras que la expresión de MMP-7, MMP-13 y TIMP-1 por las células tumorales fueron positivas y asociada significativamente con el grado histológico indiferenciado de los tumores (Tabla 11).

Células tumorales	Número de Casos	Media PSA	Rango	P
MMP-2 (-)	53	10,66	3,42-31	0,018
MMP-2 (+)	80	8,21	0,69-24,3	

**Tabla 11. Relación entre la expresión de MMPs y TIMPs por las células tumorales y el PSA pre tratamiento en pacientes con cáncer de próstata.**

Del mismo modo, encontramos una relación inversa entre MMP-2 por las células tumorales y los niveles séricos de pre-tratamiento de PSA (Tabla 9). También se encontró que TIMP-2 expresión de MIC correlaciona significativamente y negativamente con el grado tumoral (tabla 12).

Factor	Puntuación de Gleason			Total	P
	2-4	5-6	7-10		
TIMP-2 (-)	9 (9.6%)	46 (48.9%)	39 (41.5%)	94 (100%)	0.04
TIMP-2 (+)	9 (23.1%)	21 (53.8%)	9 (23.1%)	39 (100%)	

**Tabla 12. Relación expresión de TIMP-2 por MIC (células inflamatorias mononucleares) y el grado histológico en 133 carcinomas de próstata.** Los datos se representan como el número de casos (en porcentaje).

#### 4.4 RELACION ENTRE LA EXPRESIÓN DE MMPs Y TIMPs EN LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS PERITUMORALES Y LA RECIDIVA BIOQUÍMICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA LOCALIZADO.

Es de destacar el hallazgo que indica varias asociaciones con recurrencia bioquímica dependiendo del tipo celular que expresa los factores. La expresión de la MMP-13 por las células tumorales se asoció significativamente con una mayor probabilidad de recidiva bioquímica ( $p=0,012$ ) (Figura 5).

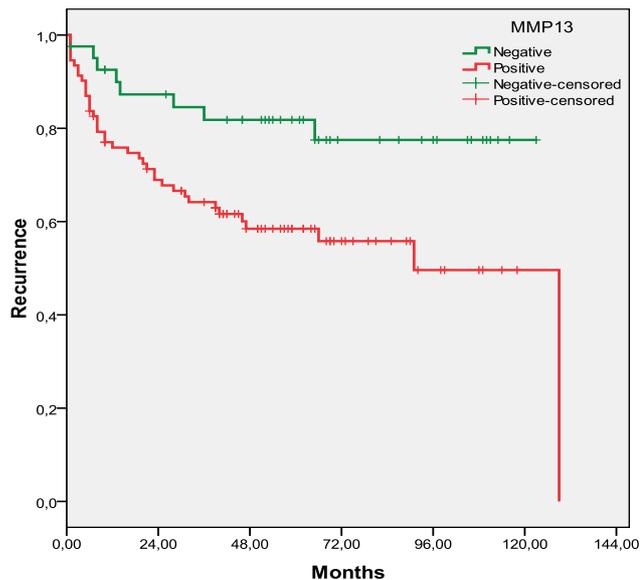


Figura 5. Probabilidad de recidiva bioquímica en función de la expresión de MMP-13 por las células tumorales ( $p=0,012$ ). MMP13 negativa (verde), mediana no alcanzada; MMP13 positiva (roja), mediana: 91 meses (IC 95%: 73,79-108,2)

La expresión de MMP / TIMP por MIC no se asoció con probabilidad de recidiva.

arc24638 29/9/15 11:25

Eliminado: -

arc24638 29/9/15 11:26

Eliminado: -

#### 4.5. IDENTIFICACIÓN DE UN FENOTIPO EN LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS PERITUMORALES EN RELACIÓN CON LAS MMPS Y LOS TIMPS, ESPECÍFICO DE TEJIDO TUMORAL Y DE TEJIDO PROSTÁTICO NO NEOPLÁSICO.

arc24638 29/9/15 11:26

Eliminado: .

Para identificar grupos específicos de tumores con distinta expresión inmunohistoquímica MMP/TIMP, los datos fueron analizados mediante análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado, por valores de puntuación y por cada tipo celular.

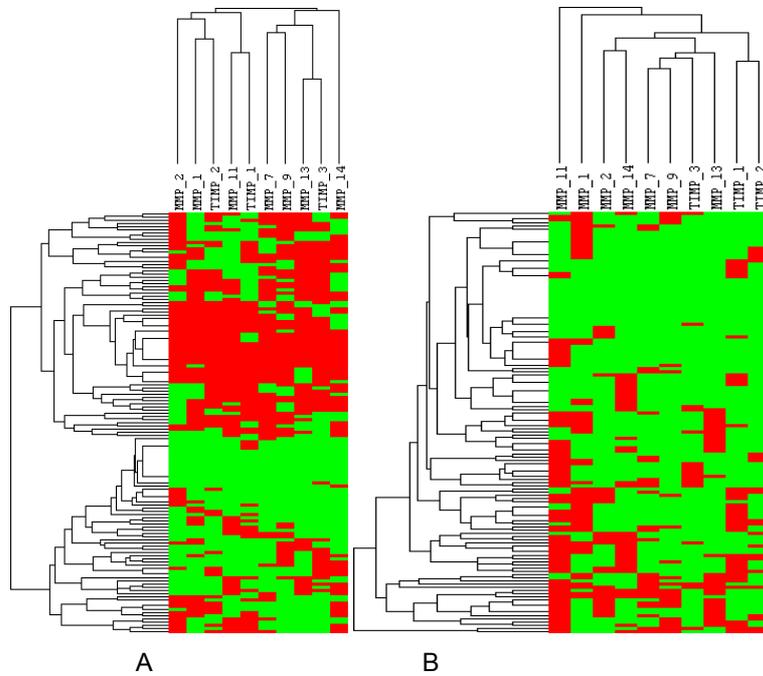
El método de agrupamiento jerárquico no supervisado organiza las proteínas en una estructura de árbol, con base en su similitud. Los datos han sido formateados de la siguiente manera: -3 designado de tinción negativa, 3 tinción positiva, los datos que faltaron se dejaron en blanco.

Los valores de puntuación se reestructuraron (positivo - negativo). Se eligió la mediana como punto de corte. Se utilizó el programa Cluster 3.0 (promedio de vinculación, de correlación de Pearson) [153].

Los resultados se muestran con Treeview (Eisen et al. 1998). El algoritmo ordenado de proteínas en el eje horizontal y las muestras en el eje vertical basado en la similitud de sus perfiles de expresión.

Cuando consideramos los casos dicotomizados con respecto a sus valores de puntuación como el uso de la mediana para cada MMP o TIMP como punto de corte, esto produjo un dendograma que muestra una división de primer orden de los tumores en dos perfiles moleculares MMP/TIMP distintas, un grupo designado como 1 con una alta expresión MMP/TIMP (n: 70) y el otro diseñado el grupo 2 (n: 63) con una baja expresión MMP/TIMP (Figura 6 A).

Sin embargo, el análisis no produjo un dendograma con grupos de clústeres bien definidos de los casos para la expresión de MMP/TIMP células inflamatorias mononucleares (Figura 6B).



**Figura 6. Representación gráfica del dendograma para valores de células tumorales (A) o en las células mononucleares inflamatorias (B).**

## 5. DISCUSIÓN



insuficiente y conduce a frecuentes biopsias de próstata y una gran proporción de biopsia negativas.

En nuestra serie el 69% de los pacientes tenía al diagnóstico un PSA menor de 10 ng/dl. A pesar de su baja especificidad y bajo valor predictivo positivo el PSA se mantiene aún como la primera línea de cribado de cáncer de próstata e indicación de biopsia [157].

Los resultados de estudios clínicos aleatorizados muestran que la prueba de PSA lleva a un riesgo significativo de sobre diagnóstico y sobre tratamiento [158].

En Estados Unidos cada año se realizan más de un millón biopsias de próstata, no encontrándose en la mayoría de ellas cáncer o diagnosticando a los pacientes de lesiones de bajo riesgo que tendrán un bajo impacto en su calidad de vida. [159]

La incidencia de biopsias negativas para cáncer de próstata en pacientes con elevación del PSA entre 3 y 10 ngr/dl es alta [160].

Cada biopsia innecesaria representa un daño real al paciente en términos de ansiedad, sangrado, malestar, y el riesgo de infección. [161].

Se necesitan biomarcadores que puedan predecir con más precisión el riesgo de padecer cáncer de próstata significativo y con ello evitar biopsias innecesarias.

Varios biomarcadores nuevos han aparecido en los últimos años el PCA3, el PHI, el test 4kScore y la utilización de la resonancia magnética nuclear para realizar biopsias mejor dirigidas y poder identificar mejor a los pacientes que posean un tumor no significativo para que se puedan beneficiar de

arc24638 29/9/15 8:16  
Eliminado: .

arc24638 29/9/15 7:59  
Eliminado: (Andriole) ... [1]

arc24638 29/9/15 10:02  
Con formato: Español

arc24638 29/9/15 7:59  
Eliminado: (Loeb)

arc24638 29/9/15 10:02  
Con formato: Español

arc24638 29/9/15 8:00  
Eliminado: Loeb S, Carter HB, Berndt SI, Ricker W, Schaeffer EM. Complications after prostate biopsy: data From SEER-Medicare. J Urol 2011;186:1830-4. .

arc24638 29/9/15 10:02  
Con formato: Fuente: Sin Negrita,

arc24638 29/9/15 10:02  
Con formato: Fuente: Sin Negrita

arc24638 29/9/15 8:03  
Eliminado: 57

arc24638 29/9/15 8:05  
Eliminado: .

arc24638 29/9/15 8:04  
Eliminado: .

arc24638 29/9/15 8:04  
Eliminado: (NAM) .

arc24638 29/9/15 10:02  
Con formato: Español

arc24638 29/9/15 8:03  
Bajado [1]: Nam RK, Saskin R, Lee Y, et al. Increasing hospital admission rates for urological complications after transrectal ultrasound guided prostate biopsy. J Urol 2013;189: S12-8. .

arc24638 29/9/15 8:05  
Eliminado: .

arc24638 29/9/15 10:03  
Con formato: Párrafo de lista, No ajustar espacio entre texto latino y asiático, No ajustar espacio entre texto asiático y números

tratamientos menos agresivos y pueda indicarse la vigilancia activa, pero ningún nuevo marcador han alcanzado aun un uso clínico generalizado,

- El Progenisa PCA3 aprobado por la FDA como marcador diagnóstico del Cáncer de Próstata, ayuda en la decisión de la rebiopsia. La sensibilidad se ha aumentado al bajar el punto de corte de 35 a 25, aunque los resultados para establecer una relación pronóstica (Estadio de Gleason y estadificación tumoral) no son concluyentes [162,163,164, 165].

- Test 4k score (Mide 4 kaliceínas, junto con la valoración del PSA), en un estudio prospectivo realizado en EEUU para valorar la precisión del test 4K más una serie de parámetros clínicos que incluían el PSA, la raza, la edad, el tacto rectal y la realización de biopsia previa en diagnosticar cánceres de alto grado (Gleason  $\geq 7$ ), mostró que el 4Kscore posee una excelente capacidad de discriminar entre los hombres que son susceptibles de padecer cánceres clínicamente relevantes ( Gleason > 7 ) y aquéllos que son susceptibles de padecer cánceres de bajo grado o sin cáncer. El estudio demostró que la prueba tiene una potencial significación para reducir el número de biopsias de próstata innecesarias [166].

- El Prostate Health Index (PHI) Índice de Salud de la Próstata es un algoritmo que incluye la isoforma PSA [- 2] proPSA con PSA total y libre. Ha demostrado aumentar el rendimiento predictivo en biopsias. [167,168].

Estudios recientes han corroborado que el PHI puede mejorar la habilidad para discriminar pacientes con y sin cáncer de próstata [169]. Aunque en uno de los estudios también demostró mayor precisión en el diagnóstico de Cáncer de próstata frente al PSA no fue tan preciso en la identificación de pacientes con cáncer de próstata de alto riesgo.

arc24638 29/9/15 10:04  
**Con formato:** Párrafo de lista, Con viñetas + Nivel: 1 + Alineación: 0,63 cm + Sangría: 1,27 cm

arc24638 29/9/15 8:05  
**Eliminado:** ... (Auprich, de la Taille, ... [2])

arc24638 29/9/15 8:06  
**Bajado [2]:** <#>Auprich M, Chun FK, Ward JF, et al. Critical assessment of preoperative urinary prostate cancer antigen 3 on the accuracy of prostate .

arc24638 29/9/15 10:02  
**Con formato:** Fuente: (Predeterminado) +Cuerpo de tema, 11 pt, Español

arc24638 29/9/15 10:04  
**Eliminado:** <#> . ... [3]

arc24638 29/9/15 10:02  
**Con formato** ... [4]

arc24638 29/9/15 10:04  
**Eliminado:** 25. .

arc24638 29/9/15 10:02  
**Con formato:** Español

arc24638 29/9/15 8:11  
**Eliminado:** . ... [5]

arc24638 29/9/15 10:02  
**Con formato:** Español

arc24638 29/9/15 10:05  
**Eliminado:** 470 .

arc24638 29/9/15 8:13  
**Eliminado:** ( Hori ; Catalona)

arc24638 29/9/15 8:14  
**Eliminado:** .

arc24638 29/9/15 8:13  
**Bajado [4]:** Hori S, Blanchet J-S, McLoughlin J. From prostate-specific antigen (PSA) to precursor PSA (proPSA) isoforms: a review of the emerging role of proPSAs in the detection and management of early prostate cancer. BJU Int 2013;112:717–28. .

arc24638 29/9/15 10:06  
**Con formato:** Sangría: Izquierda: 1,25 cm, EspacioPosterior: 10 pto, Adjust space between Latin and Asian text, Adjust space between Asian text and

arc24638 29/9/15 10:05  
**Eliminado:** . . ... [6]

arc24638 29/9/15 10:02  
**Con formato:** Fuente: Sin Negrita

arc24638 29/9/15 10:06  
**Eliminado:** -5. . ... [7]

arc24638 29/9/15 10:02  
**Con formato:** Fuente: Sin Negrita

arc24638 29/9/15 8:15  
**Bajado [5]:** Lazzeri M, Briganti A, Scattoni V, et al. Serum index test % [-2]proPSA and Prostate Health Index are more accurate tan prostate specific antigen and % fPSA in predicting a ... [8]

arc24638 29/9/15 10:02  
**Con formato** ... [9]

Por tanto aunque, no hay diferencias en la discriminación de Cáncer de próstata y en la identificación de cánceres de alto grado entre la 4k Score y PHI, estos test sanguíneos ayudan a la decisión de realizar biopsia junto con el PSA y a identificar a pacientes de mayor riesgo [170].

arc24638 29/9/15 10:07  
**Con formato:** Fuente: (Predeterminado) Arial, 12 pt  
arc24638 29/9/15 10:07  
**Con formato:** Normal,Sangría: Izquierda: 1,25 cm, Sin viñetas ni numeración

Aunque disponemos marcadores biológicos para identificar pacientes con cáncer de próstata, la tasa de detección de cáncer de próstata es de aproximadamente 40-45% para una biopsia de próstata guiada por ecografía transrectal [171].

arc24638 29/9/15 8:18  
**Eliminado:** ( Nordstro)  
arc24638 29/9/15 8:19  
**Eliminado:** - ... [10]  
arc24638 29/9/15 10:02  
**Con formato** ... [11]

La utilización de otras pruebas de imagen como la biopsia guiada por resonancia magnética no se han detectado más cánceres que con la guiada por ecografía lo que si se ha encontrado es una mayor tasa de detección de cánceres significativos [172] y una menor tasa de detección de cánceres insignificantes si lo comparamos con la biopsia guiada por ecografía [173].

arc24638 29/9/15 10:11  
**Eliminado:** L...a tasa de detección de ... [12]

Todas estas pruebas de imagen y biomarcadores tienen el objetivo de mejorar la precisión en la estratificación del cáncer de próstata ya que es esencial en el momento del diagnóstico y al tomar la decisión terapéutica identificar aquellos pacientes con alto riesgo de mortalidad cáncer específico. Estos pacientes tienen más probabilidad de beneficiarse de una terapia más agresiva y por lo tanto es importante diferenciarlos de la gran mayoría de los pacientes que se van a beneficiar de la cirugía y tienen un bajo riesgo de mortalidad por cáncer de próstata.

arc24638 29/9/15 10:02  
**Con formato:** Español

arc24638 29/9/15 8:20  
**Eliminado:** -

arc24638 29/9/15 10:02  
**Con formato:** Español

arc24638 29/9/15 8:19  
**Bajado [6]:** Lane BR, Zippe CD, Abouassaly R, Schoenfeld L, Magi-Galluzzi C, Jones JS. Saturation technique does not decrease cancer detection during followup after initial prostate biopsy. J Urol 2008;179:1746-50. .

arc24638 29/9/15 10:08  
**Eliminado:** - ... [13]

arc24638 29/9/15 10:02  
**Con formato:** Fuente: Sin Negrita,

arc24638 29/9/15 10:15  
**Eliminado:** - ... [14]

arc24638 29/9/15 10:02  
**Con formato:** Fuente: Sin Negrita,

arc24638 29/9/15 10:15  
**Eliminado:** - ... [15]

Recientes publicaciones demuestran que si combinamos la valoración postquirúrgica del cáncer de próstata que predice la recurrencia bioquímica y la mortalidad específica del cáncer de próstata [174], utilizando el PSA preoperatorio, los datos clínicos de extensión y la anatomía patológica junto con la valoración de parámetros genómicos, aumentamos la precisión en la identificación de pacientes de riesgo [175].

arc24638 29/9/15 8:24  
**Eliminado:** (Cooperberg) ...utilizando ... [16]

arc24638 29/9/15 8:24  
**Eliminado:** - ... [17]

arc24638 29/9/15 10:02  
**Con formato** ... [18]

La necesidad de optimizar la elección del tratamiento ha llevado al European Multicenter Prostate Cancer Clinical and Translational Research Group (EMPaCT) a la estratificación de pacientes de alto riesgo en subgrupos pronósticos identificando tres grupos de pacientes en función de la presencia o no de uno o varios de los siguientes factores de riesgo; PSA < 20 ngr /ml o PSA > 20 ngr /ml, Puntuación de Gleason 2-7 versus 8 -10 y Estadio clínico cT 1-2 frente a c T3-4. Se clasificaron como de buen pronostico aquéllos que solo tenían un factor de riesgo, pronostico intermedio si tenía un PSA > 20 ngr / ml y cT3-4 y mal pronóstico si tenía Gleason 8-10 y PSA > 20 ngr/ml o Estadio cT3-4. La tasa de supervivencia para los grupos de buen, intermedio y mal pronóstico fueron a los 5 años de 98,7 %, 95,4 % y 96,5 % y a los 10 años de 88,3 , 88,8 , y 79,7 [176].

Es evidente la preocupación de la comunidad urológica por identificar marcadores que nos permitan seleccionar grupos de pacientes para poder personalizar los tratamientos.

¿Pueden las metaloproteinasas o sus inhibidores tener un papel en la identificación de estos pacientes con tumores más agresivos o en la identificación de biopsias negativas de factores de riesgo?

arc24638 29/9/15 8:28

**Bajado [8]:** Joniau S., Briganti A., Gontero P., Gandaglia G., Tosco L., Fieuws S., Tombal B., Marchioro G., Walz J. g., Burkhard Kneitz B., Bader P., Frohneberg D., Tizzani A., Graefen M., van Cangh P., Karnes J., Montorsi F., Van Poppel H., Spahn M. Stratification of High-risk Prostate Cancer into Prognostic Categories: A European Multi-institutional Study. Eur Urol 2015; 67: 157 -164 .

arc24638 29/9/15 10:02

**Con formato:** Fuente: Sin Negrita,

arc24638 29/9/15 10:02

**Con formato:** Fuente: Sin Negrita

arc24638 29/9/15 8:28

**Eliminado:** -

arc24638 29/9/15 10:20

**Eliminado:** ?

## EXPRESIÓN DE LAS MMPs EN MIC DEL ESTROMA Y SU RELACION CON LA PRESENCIA DE CANCER DE PRÓSTATA

La mayor expresión de las MMP ( MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-11, MMP-13, MMP-14) y TIMP ( TIMP-1, TIMP-2, TIP-3) en los carcinomas de próstata frente a la expresión en las muestras de PIN y HBP reflejan el importante papel de estos factores en la biología molecular de estos tumores. Los hallazgos de altos niveles de expresión de algunos MMP y TIMP podría ayudarnos a identificar en pacientes con HBP o PIN quiénes pueden desarrollar cáncer de próstata, lo que puede ser importante respecto a diseñar estrategias preventivas y a realizar más estudios de prevención del cáncer de próstata basado en la inhibición enzimática del sistema MMP / TIMP.

La variabilidad de la expresión de las MMP en el cáncer de próstata, apoyan la heterogeneidad biológica del carcinoma de próstata con respecto a las expresiones de estos parámetros implicados en la invasión tumoral y la metástasis, estando implicados en procesos básicos de la progresión del tumor, como la degradación de la membrana basal y la matriz extracelular, la estimulación de la proliferación celular, la motilidad celular, la resistencia a la apoptosis y la angiogénesis [177,118].

Por lo tanto, esta variabilidad en la expresión global de la MMP y TIMP que mostramos en el estudio, puede estar relacionado con la diversa evolución [118,177] clínica de los tumores de próstata, proporcionando tanto información pronóstica clínica como predictiva. Además, nuestros resultados pueden contribuir a establecer nuevas dianas terapéuticas en el cáncer de próstata basadas en la inhibición selectiva de las MMP.

Recientemente se ha publicado que los flavonoides quercetina, paigenina, crina, kaempferol y 3', 4'-dihidroflavona en estudios in vitro e in vivo de células de glioblastoma humano han reducido la expresión y actividad de la metaloproteinasas lo que producido un retraso en la migración de estas células tumorales. [178]

arc24638 29/9/15 10:02

Con formato: Fuente: (Predeterminado)  
Arial

arc24638 29/9/15 10:21

Eliminado: 7

arc24638 29/9/15 8:30

Eliminado: (Vizoso y Escaf)

arc24638 29/9/15 8:31

Eliminado: (ESCAF / VIZOSO)

arc24638 29/9/15 10:02

Con formato: Color de fuente:

arc24638 29/9/15 8:31

**Bajado [9]:** Escaff S., Fernández JM., González L, Suárez A., González-Reyes S., González 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 DOI 10.1007/s00345-010-0595-6

arc24638 29/9/15 8:34

Eliminado: - ... [19]

arc24638 29/9/15 10:02

Con formato: Fuente: Sin Negrita

arc24638 29/9/15 10:27

Eliminado: -

arc24638 29/9/15 10:27

Con formato: Normal, Sangría: Izquierda: 0 cm

arc24638 29/9/15 10:02

Con formato: Fuente: (Predeterminado)  
Arial

No sólo las células tumorales son el tipo celular que expresa MMPs y TIMPs en el escenario neoplásico. En el estroma peritumoral estos factores también se expresan en las células inflamatorias mononucleares.

Estos datos indican que los componentes celulares de estroma tumoral también contribuyen a la producción de MMP y TIMP, y por tanto pueden estas células estar implicadas en algunos aspectos de la progresión del tumor. Es un notable hallazgo identificar en las células mononucleares inflamatorias del carcinoma de próstata una mayor expresión de las MMP y TIMP de que la que expresan en las patologías no malignas como son la HBP o el PIN.

Estos datos podrían ser relevantes en relación con la posibilidad de que la expresión de estos factores por las células del estroma pueda contribuir a los diagnósticos de cáncer de próstata en pacientes con biopsia negativa. Esto se debe a que hay un porcentaje de falsos negativos en las biopsias de los carcinomas de próstata, en los que no se detectan células cancerosas.

El papel de los MIC, se ha visto en los tumores de mama, donde la sobreexpresión de la MMP11 en células mononucleares inflamatorias hace que estos tumores sean más agresivos y con metástasis a distancia. [179]

La presencia de marcadores tisulares MMPs y/o TIMPs en MICA, en el tejido aparentemente sano (sin células tumorales demostrables en la biopsia) puede añadir información útil para la detección de carcinoma de próstata y podrían indicar que en la cercanía exista un tumor y por tanto, junto con otras herramientas como las son los biomarcadores PCA3 urinario, índice de PSA libre en sangre, PHI o 4K en sangre pueden ayudar a la toma de una decisión diagnóstica más potente sobre la necesidad de rebiopsiar, dado que todavía no tenemos recursos lo suficientemente fiables, incluidas las

arc24638 29/9/15 8:34

Eliminado: -

arc24638 29/9/15 8:33

**Bajado [10]:** Santos BL, Oliveira MN, Coelho PL, Pitanga BP, da Silva AB, Adelita T, Silva VD, Costa MF, El-Bachá RS, Tardy M, Chneiweiss H, Junier MP, Moura-Neto V, Costa SL. Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. Chem Biol Interact. 2015 Sep 22. S0009-2797(15)30028-4. doi: 10.1016/j.cbi.2015.07.014 -

arc24638 29/9/15 10:02

Con formato: Fuente: (Predeterminado)

arc24638 29/9/15 10:02

Con formato: Fuente: (Predeterminado)

Arial, 12 pt

arc24638 29/9/15 8:34

Eliminado: -

arc24638 29/9/15 10:36

Eliminado: pueden

arc24638 29/9/15 10:36

Eliminado: rse

arc24638 29/9/15 10:37

Eliminado: -

arc24638 29/9/15 10:37

Eliminado: hallazgo

arc24638 29/9/15 10:38

Eliminado: en

arc24638 29/9/15 10:38

Eliminado: las células mononucleares inflamatorias del carcinoma de próstata

arc24638 29/9/15 10:39

Eliminado: -

arc24638 29/9/15 10:41

Eliminado: Como

arc24638 29/9/15 10:49

Eliminado: -

... [20]

arc24638 29/9/15 8:35

**Bajado [11]:** Eiró N, González L, González LO, Fernandez-Garcia B, Lamelas ML, Marín L, González-Reyes S, del Casar JM, Vizoso FJ. Relationship between the inflammatory ... [21]

arc24638 29/9/15 10:02

Con formato: Fuente: Sin Negrita

arc24638 29/9/15 10:41

Con formato: Fuente: Sin Negrita,

arc24638 29/9/15 10:02

Con formato: Fuente: Sin Negrita

arc24638 29/9/15 10:48

Eliminado: El empleo de potenciales

arc24638 29/9/15 10:48

Eliminado: (como

arc24638 29/9/15 10:48

Eliminado:

arc24638 29/9/15 10:49

Eliminado: )

nuevas técnicas de resonancia para determinar si una próstata con una biopsia negativa hay que rebiopsiarla o se puede observar.

Puede que no aparezcan estos marcadores tisulares en la biopsia y que, por tanto pueda evitarse una rebiopsia a la espera de que el PSA y el resto de marcadores plasmáticos (índice de PSA, 4K) o urinarios (PCA3) se estabilicen, siendo un ahorro significativo en costes, morbilidad (las biopsias tienen complicaciones [161] y preocupación de los pacientes (que no saben si tienen un tumor o no). Incluso es posible que puedan establecerse nomogramas o tablas para mejorar la decisión en este aspecto en el futuro en el que se integren marcadores plasmáticos, urinarios o tisulares, en este caso como las MMPs de los MICs estromales que hemos encontrado sobreexpresadas en los casos de tumor.

arc24638 29/9/15 8:37

Eliminado: (NAM)

arc24638 29/9/15 10:02

Con formato: Fuente: (Predeterminado)

Arial

arc24638 29/9/15 10:02

Con formato: Fuente: (Predeterminado)

Arial

## RELACIÓN DE LA EXPRESION DE LAS MMPs Y TIMPS EN CÉLULAS MONONUCLEARES INFLAMATORIAS CON FACTORES CLINICO PATOLÓGICOS Y EVOLUCIÓN POST PROSTATECTOMÍA

Las MMPs se relacionan con el estadio y con el grado. Las MMP1 y TIMP2 con el estadio tumoral y de TIMP2 con el score Gleason, de tal forma que la sobreexpresión de estos marcadores se asoció a menor estadio y grado.

La expresión de la MMP-2 en las células tumorales tiene una asociación significativa con los tumores de bajo grado histológico, esto sugiere que esta MMP está asociada con un comportamiento menos agresivo en los carcinomas de próstata.

Por contrario, la expresión de MMP-7 [180,181], MMP-13 [184,185] y TIMP-1 en las células tumorales se asocia con tumores de alto grado histológico y la agresividad del tumor es mayor.

Nuestros resultados indican diferentes asociaciones clínicas de las expresiones de las MMP y TIMP con el estadio tumoral y el Grado de Gleason en función de sus expresiones por las células tumorales o células del estroma peritumoral.

La supresión de la MMP-7 se asocia con una baja capacidad de invasión y crecimiento tumoral [182]. Hay datos publicados que la sobreexpresión de la MMP-7 en las células del cáncer de mama aumenta la invasividad celular y la activación de las proMMP-2 y MMP-9 [183]. También se han publicado que en el cáncer de mama que los altos niveles de MMP-7 se asociaron significativamente con varios parámetros indicativos de la agresividad del tumor y se vinculan con una alta incidencia de metástasis a distancia en el cáncer de mama [118].

arc24638 29/9/15 10:02  
Con formato: Fuente: (Predeterminado)  
Arial, Negrita

arc24638 29/9/15 8:38  
Eliminado: con factores clínico patológicos y evolución post prostatectomía

arc24638 29/9/15 10:02  
Con formato: Fuente: (Predeterminado)  
Arial, Negrita

arc24638 29/9/15 10:02  
Con formato: Fuente: (Predeterminado)  
Arial

arc24638 29/9/15 10:58  
Eliminado: -

arc24638 29/9/15 10:02  
Con formato: Fuente: (Predeterminado)  
Arial

arc24638 29/9/15 8:42  
Eliminado: - ... [22]

arc24638 29/9/15 11:08  
Eliminado: eliminación

arc24638 29/9/15 8:40  
Eliminado: 60

arc24638 29/9/15 8:40  
Eliminado: 61

Sin embargo, en el presente estudio, la MMP-7 se asoció de forma negativa pero estadísticamente significativa con los niveles séricos pretratamiento de PSA, lo cual no tiene una explicación razonable en la actualidad.

arc24638 29/9/15 11:10

**Eliminado:** ..

arc24638 29/9/15 11:11

**Eliminado:** MMP-13 se ha encontrado (colagenasa-3) que tiene una especificidad de sustrato excepcionalmente alta en comparación con otras MMP [162,163]. Por otra parte, se cree que desempeñan un papel central en la cascada de activación de las MMP, tanto activando como siendo activada por otras MMPs (MMP-14, MMP-2 o MMP-3).

**RELACION ENTRE LA EXPRESIÓN DE MMPs Y TIMPs EN LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS PERITUMORALES Y EL PRONÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA LOCALIZADO.**

Nuestros hallazgos indican que la expresión global de la MMP-13 por células tumorales se asocia con una recurrencia bioquímica mayor en el carcinoma de próstata, lo que está en consonancia con los datos del cáncer de mama que asocia la expresión de estos factores con un peor pronóstico [118,186].

La realización de análisis de agrupamiento jerárquico identifica dos perfiles moleculares de expresión global de las células tumorales MMPs/TIMPs en el cáncer de próstata, sin embargo no se han podido identificar fenotipos de expresión global de MMP/TIMP en las células inflamatorias mononucleares, como sí se encontraron en estudios realizados en el cáncer de mama, [186].

La baja expresión de los MMP y TIMP de las células inflamatorias frente a las células tumorales, puede que sea uno de las causas que dificulta la identificación de fenotipo en las células inflamatorias peritumorales.

Futuros trabajos que identifiquen mayor expresión de estos factores podrán proporcionar una mejor información que la que proporcionamos en este trabajo.

arc24638 29/9/15 10:51  
Eliminado: el pronóstico del

arc24638 29/9/15 10:02  
Con formato: Fuente: (Predeterminado)

arc24638 29/9/15 8:41  
Eliminado: 64

arc24638 29/9/15 10:02  
Con formato: Fuente: (Predeterminado)

arc24638 29/9/15 8:41  
Eliminado: 4

arc24638 29/9/15 10:51  
Eliminado: o

## 6. CONCLUSIONES

- a. El estudio de las metaloproteinasas en las células mononucleares inflamatorias del estroma prostático mostro una importante expresión de MMP1 y MMP2 (ambos del 58,5%) y de los inhibidores TIMP1 y TIPM2, de un 52,3 y 50,8%, respectivamente
- b. Se encontraron diferencias estadísticas en la expresión de metaloproteinasas 1, 2, 11, 14, TIMP1 y TIMP2 de las células mononucleares del estroma que fue significativamente mayor en el tejido tumoral que en el de HBP o PIN.
- c. Se objetivó una relación inversa de MMP1 y TIMP2 con el estadio tumoral y de TIMP2 con el score Gleason, de tal forma que la sobreexpresión de estos marcadores se asoció a menor estadio y grado.
- d. Sin embargo, no se evidenció una relación entre la expresión de metaloproteinasas en las células inflamatorias mononucleares y recidiva bioquímica tras prostatectomía radical.
- e. Tampoco pudimos demostrar un grupo bien definido de expresión de MMPs-TIMPs en las células inflamatorias peritumorales que presentara un patrón evolutivo específico.

Aunque no se ha demostrado un papel en el pronóstico del cáncer de próstata localizado, las MMPs en MICs pueden servir como marcadores tisulares de la potencial existencia de un tumor en caso de biopsias negativas de próstata y servir junto a otros marcadores como guía para seleccionar pacientes que requerirán una re\_biopsia

## 7. BIBLIOGRAFIA

arc24638 29/9/15 11:12

Eliminado: í

1. Global Burden of Disease Cancer Collaboration. The Global Burden of Cancer 2013. **JAMA Oncol.** 2015 Jul 1;**1(4):505-27.**
2. Siegel, R., Ma J., . Zou Z., and Jemal A. "Cancer statistics, 2014." **CA Cancer J. Clin.** , 2014: **64, 9–29.**
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base* . Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013, 2012.
4. Eastham JA, Riedel E, Scardino PT, Shike M, Fleisher M, Schatzkin A, Lanza E, Latkany L, Begg CB. Polyp Prevention Trial Study Group Variation of serum prostate-specific antigen levels: an evaluation of year-to-year fluctuations. **JAMA.** , 2003: **289(20):2695–7.**
5. Penson DF, Rossignol M, Sartor AO, Scardino PT, Abenhaim LL. Prostate cancer: epidemiology and health-related quality of life. **Urology.** , 2008: **72(6 Suppl):S3–11**
6. Bray F, Lortet-Tieulent J, Ferlay J, Forman D, Auvinen A. Prostate cancer incidence and mortality trends in 37 European countries: An overview. *Eur J Cancer*, 2010: 46:3040---52
7. Granado de la Orden S, Saá Requejo C, Quintás Viqueira A. Epidemiological situation of prostate cancer in Spain. *Actas Urol Esp*, 2006: 30:574-82.
8. Mickevičienė A, Vanagas G, Ulys A, Jievaltas M, Smailytė G, Padaiga Ž. Factors affecting health-related quality of life in prostate cancer patients. **Scand J Urol Nephrol.** , 2012: **46(3):180–7.**
9. Bellmunt, J., y W.K. Oh. Castration-resistant prostate cancer: New science and therapeutic prospects. **Ther. Adv. Med. Oncol.** , 2010: **2, 189–207.**

10. De Bono, J.S., y otros. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: A randomised open-label trial. **Lancet** 2010, **376**, 1147–1154.
11. Kantoff, P.W., y otros. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. **N. Engl. J. Med.** , 2010: **363**, 411–422.
12. Vapiwala, N., y E. Glatstein. Radium-223 in prostate cancer. **N. Engl. J. Med**, 2013: **369**, 1660.
13. Patel AR, Klein EA. Risk factors for prostate cancer» **Nat Clin Pract Urol**, 2009: **6(2):87-95**.
14. Goh CL, Schumacher FR, Easton D, Muir K, Henderson B, Kote-Jarai Z, Eeles RA. Genetic variants associated with predisposition to prostate cancer and potential clinical implications **J Intern Med.**, 2012: **271(4):353-65**.
15. Hemminki. Familial risk and familial survival in prostate cancer **World J Urol.**, 2012: **30(2): 143-148**.
16. Wu AH, Whittemore AS, Kolonel LN, John EM, Gallagher RP, West DW, et al. Serum androgens and sex hormone-binding globulins in relation to lifestyle factors in older African-American, white, and Asian men in the United States and Canada **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, 1995: **4(7):735-741**.
17. Stacewicz-Sapuntzakis M, et al. Correlations of dietary patterns with prostate health. **Mol Nutr Food Res.** 2008: **52:114-130**.
18. Thompson D1, Easton DF. Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. **J Natl Cancer Inst.**, 2002: **18; 94(18)**.
19. Denis L, Murphy GP. Overview of phase III trials on combined androgen treatment in patients with metastatic prostate cancer **Cancer**, 1993: **72:3888–95**.

20. Trachtenberg J, Blackledge G. Advances in the management of hormone-refractory prostate cancer. *Eur Urol Suppl*, 2002: 1:44–53.
21. De Marzo A. M., Platz E. A., Sutcliffe S., Xu J., Grönberg H., Drake C. G., et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* , 2007: 7, 256–269
22. Sciarra A., Di Silverio F., Salciccia S., Aufran Gomez A. M., Gentilucci A., Gentile V. Inflammation and chronic prostatic diseases: evidence for a link? *Eur. Urol.*, 2007: 52, 964–972.
23. Dennis, L.K.,Dawson,D.V. Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer. *Epidemiology* , 2002: 13, 72–79.
24. Palapattu G. S., Sutcliffe S., Bastian P. J., Platz E. A., De Marzo A. M., Isaacs W. B., et al. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis* 26, 1170–1181, 2005: 26, 1170–1181.
25. Roberts R. O., Bergstralh E. J., Bass S. E., Lieber M. M., Jacobsen S. J. Prostatitis as a risk factor for prostate cancer *Epidemiology*, 2004: 15, 93–99.
26. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation *Nature*, 2008 ;454(7203): 436–44.
27. St Hill CA, Lutfiyya MN. An epidemiological analysis of potential associations between C-reactive protein, inflammation, and prostate cancer in the male US population using the 2009-2010 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) data.» *Front Chem.*, 2015: 3: 55.
28. Houda Bahig, Daniel Taussky, Guila Delouya, Amal Nadiri, Ariane Gagnon-Jacques, Paule Bodson-Clermont. Neutrophil count is associated with survival in localized prostate cancer.» *BMC Cancer*, 2015: 15:594.

29. Roxburgh CS, McMillan DC.. Role of systemic inflammatory response in predicting survival in patients with primary operable cancer. *Future Oncol.*, 2010; 6(1):149–63.
30. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.*, 2011: 144(5):646–74.
31. Sumbul AT, Sezer A, Abali H, Kose F, Gultepe I, Mertsoylu H, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts PSA response, but not outcomes in patients with castration-resistant prostate cancer treated with docetaxel. *Int Urol Nephrol.* , 2014: 46(8):1531–5.
32. Keizman D, Gottfried M, Ish-Shalom M, Maimon N, Peer A, Neumann A, et. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio in metastatic castration-resistant prostate cancer patients treated with ketoconazole association with outcome and predictive nomogram. *Oncologist*, 2012: 17(12):1508–14.
33. Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE, et al. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med.* 2010, 2010: 16(2):219–23.
34. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL 3rd, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* 2009 Mar; 360(13):1310-9.
35. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* 2009 Mar;360(13):1320-8.
36. Ilic D, Neuberger MM, Djulbegovic M, et al. Screening for prostate cancer *Cochrane Database Syst Rev* 2013 Jan;1:CD004720.
37. Vasarainen H, Malmi H, Määttänen L, et al. Effects of prostate cancer screening on health-related quality of life: results of the Finnish arm of the European randomized screening trial (ERSPC). *Acta Oncol* 2013 Nov;52(8):1615-21

38. Hessels D, van Gils MP, van Hooij O, et al. Predictive value of PCA3 in urinary sediments in determining clinico-pathological characteristics of prostate cancer. **Prostate** 2010 Jan;**70(1):10-6**.
39. Auprich M, Bjartell A, Chun FK, et al. Contemporary role of prostate cancer antigen 3 in the management of prostate cancer. **Eur Urol** 2011 Nov; **60(5):1045-54**.
40. Cayuela A, Lacalle JR, Gili M. Analysis of cohort mortality from prostatic cancer in Spain, 1951-1983 **J Epidemiol Community Health**, 1989; **43: 249--52**.
41. Bolumar F, Vioque J, Cayuela A. «Changing mortality patterns for major cancers in Spain, 1951-1985.» **Int J Epidemiol.**, 1991: **20:20-5**.
42. Cayuela A, Rodríguez S, Vigil E, Barrero BR. Cambios recientes en la mortalidad por cáncer de próstata en España: estudio de tendencias en el periodo 1991-2005. **Actas Urol Esp**, 2008: **32:184---9**.
43. Malvezzi M, Bertuccio P, Rosso T, Rota M, Levi F, La Vecchia C, et al. European cancer mortality predictions for the year 2015: Does lung cancer have highest death rate in EU women?. **Ann Oncol**, 2015: **26:779-86**.
44. Cayuela, L. Cayuela, M.V. Ruiz-Romero, S. Rodríguez-Domínguez, G. Lendínez-Cano y J. Bachiller-Burgos. ¿Ha dejado de disminuir la mortalidad por cáncer de próstata en España? **Actas Urológicas Españolas**, 2015: [Http://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2015.06.001](http://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2015.06.001)
45. Gleason. Classification of prostatic carcinomas. **Cancer Chemothermother**, 1966: **50:125–8**.
46. Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. **UICC International Union Against Cancer. 7th edn. Wiley-Blackwell**, 2009: **243-248**.
47. Epstein JI, Allsbrook Jr WC, Amin MB, Egevad LL ISUP Grading Committee. The 2005 International Society of Urological Pathology.

- «(ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol* , 2005;29:1228–42.
48. Cooperberg MR, Pasta DJ, Elkin EP, et al. Risk Assessment score: a straightforward and reliable preoperative predictor of disease recurrence after radical prostatectomy. *J Urol* , 2005 : 73(6):1938-42.
49. Mottet N., Bellmunt J., Briers E., van den Bergh R., Bolla M., van Casteren N.J., Cornford P. *Guidelines on Prostate Cancer*. Amsterdam: **EAU Guideliness, 2015.**
50. Bill-Axelson A, Holmberg L, Garmo H, et al. Radical prostatectomy or watchful waiting in early prostate cancer. *N Engl J Med.*, 2014: **370(10):932-942.**
51. Roehl KA, Han M, Ramos CG, Antenor JA, Catalona WJ. Cancer progression and survival rates following anatomical radical retropubic prostatectomy in 3,478 consecutive patients: long-term results *WJ J Urol.* , 2004: **172(3):910-914.**
52. Algarra R, Zudaire J, Rosell D, Robles JE, Berián JM, Pascual. Course of the type of patient who is candidate for radical prostatectomy over 2 decades (1989–2009) *Actas Urol Esp*, 2013: **37:347-53.**
53. Cahlon O, Zelefsky MJ, Shippy A, Chan H, Fuks Z, Yamada Y, et al. Ultrahigh dose (86.4 Gy) IMRT for localized prostate cancer: toxicity and biochemical outcomes *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008: **71(2):330-337.**
54. Zelefsky MJ, Chan H, Hunt M, Yamada Y, Shippy AM, Amols H. Long-term outcome of high dose intensity modulated radiation therapy for patients with clinically localized prostate cancer. *J Urol.* 2006, 2006: **176(4 PT 1):1415-1419.**
55. Cahlon O, Zelefsky MJ, Shippy A, Chan H, Fuks Z, Yamada Y, et al. Ultrahigh dose (86.4 Gy) IMRT for localized prostate cancer: toxicity and biochemical outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 2008: **71(2):330-337.**

56. Grimm PD, et al.. 10-year biochemical (prostate-specific antigen) control of prostate cancer with (125)I brachytherapy. . *Int J Radiat Biol Phys.* , 200: 51(1):31-40.
57. Potters L, Morgenstern C, Calugaru E, Fearn P, Jassal A, Presser J, et al.. 12-year outcomes following permanent prostate brachytherapy in patients with clinically localized prostate cancer. *J Urol.*, 2005: 173(5):1562-1566.
58. Joniau S1, Hsu CY, Gontero P, Spahn M, Van Poppel H. Radical prostatectomy in very high-risk localized prostate cancer: long-term outcomes and outcome predictors. *Scand J Urol Nephrol.* , 2012: 46:164-171.
59. Engel J, Bastian PJ, Baur H, Beer V, Chaussy C, Gschwend JE, et al. Survival benefits of radical prostatectomy in lymph-node positive patients with prostate cancer. *Eur Urol.* , 2010: 57(5):754-761.
60. Shelley MD, Kumar S, Wilt T, Staffurth J, Coles B, Mason MD. A systematic review and meta-analysis of randomised trials of neoadjuvant hormone therapy for localised and locally advanced prostate carcinoma. *Cancer Treat Rev.*, 2009: (35):9-17.
61. Bolla M, Van Poppel H, et al. Europe Organisation for Research and treatment of cancer, radiation oncology and genitourinary groups. Postoperative radiotherapy after radical prostatectomy for high-risk prostate cancer: long-term results of a randomised controlled trial. EORTC trial co. *Lancet*, 2012: 380(9858):2018-2027.
62. Vickers AJ, Cronin AM, Aus G, Pihl CG, Becker C, Pettersson K, Scardino PT, Hugosson J, Lilja H:. A panel of kallikrein markers can reduce unnecessary biopsy for prostate cancer: data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Goteborg, Sweden. *BMC Med* , 2008: 6:19.
63. Benchikh A, Savage C, Cronin A, Gilles Salama G, Villers A, Lilja H, Vickers A. A panel of kallikrein markers can predict outcome of prostate

biopsy following clinical work-up: an independent validation study from the European Randomized Study of Prostate Cancer screening France. **BMC Cancer** , 2010: 10:635.

64. Vickers AJ, Cronin AM, Aus G, Pihl CG, Becker C, Pettersson K, Scardino PT, Hugosson J, Lilja H: A panel of kallikrein markers can reduce unnecessary biopsy for prostate cancer: data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Goteborg, Sweden. **BMC Med** , 2008: 6:19.
65. Donohue JF, Bianco FJ Jr, Kuroiwa K, et al. Poorly differentiated prostate cancer treated with radical prostatectomy: long-term outcome and incidence of pathological downgrading. **J Urol** , 2006 : 176:991-995.
66. Budiharto T, Joniau S, Lerut E, et al. Prospective evaluation of 11C-choline positron emission tomography/computed tomography and diffusion-weighted magnetic resonance imaging for the nodal staging of prostate cancer with a high risk of lymph node metastases. **Eur Urol** , 2011: 60(1):125-30
67. Briganti A, Larcher A, Abdollah F, et al. Updated Nomogram Predicting Lymph Node Invasion in Patients with Prostate Cancer Undergoing Extended Pelvic Lymph Node Dissection: The Essential Importance of Percentage of Positive Cores. **Eur Urol** , 2012 : 61(3):480-7.
68. Joniau S, Van den Bergh L, Lerut E, et al. Mapping of pelvic lymph node metastases in prostate cancer. **Eur Urol** , 2013 : 63(3):450-8.
69. Yossepowitch O, Eggener SE, Bianco FJ Jr, et al. Radical prostatectomy for clinically localized, high risk prostate cancer: critical analysis of risk assessment methods. **J Urol** , 2007 : 178(2): 493-9.
70. Briganti A, Chun FK, Salonia A, Zanni G, Scattoni V, Valiquette L, et al. Validation of a nomogram predicting the probability of lymph node invasion among patients undergoing radical prostatectomy and an extended pelvic lymphadenectomy. **Eur Urol** , 2006: 49(6):1019-26.

71. Fidler IJ, Hart IR. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. **Science** 1982: 217;998-1003.
72. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. **Lab Invest**, 1983: 49:636-49
73. Alvaro Naranjo T., Noguera Salva R., y Fariñas Guerrero F. LA matriz extracelular: Morfología , función y bioseguridad. **Revista española de Patología**, 2009: Vol 42, nº 4.
74. Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, et al.. Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts **Lab Invest**. 1983; 49:140-7.,
75. Hynes Ro. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell**, 1987: 48:549-54.
76. Rao CN, Castronovo V, Schmitt MC, et al. Evidence for a precursor of the high-affinity metastasis associated murine laminin receptor. **Biochemistry**, 1989: 28:7476-86.
77. Liotta LA, Abe S, Robey PG, et al. Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor **Proc Natl Acad Sci EEUU**, 1979: 76: 2268-72.
78. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, et al. Metastatic potential correlates with degradation of basement membrane collagen. **Nature.**, 1980: 284:67-8.
79. Guirguis R, Margulies I, Taraboletti G, et al. Cytokine-induced pseudopodial. Cytokine-induced pseudopodial protrusion is coupled to tumour cell migration. **Nature.**, 1987: 329:261-3.
80. Luna EJ, Condeelis JS. Actin-associated proteins in Dictyostelium discoideum. **Dev Genet**, 1990: 11:328-32.
81. Liotta LA. Mechanisms of cancer invasion and metastasis. **Adv Oncol.** , 1985: 28-41.

82. Ostrowski LE, Finch J, Krieg P, et al. Expression pattern of a gene for a secreted metalloproteinase during late stages of tumor progression. ***Mol Carcinog*, 1988: 1:13-9.**
83. Templeton NS, Brown PD, Levy AT et al. Cloning and charecterization of human tumor cell collagenase ***cancer Res.*, 1990: 50:5431-7.**
84. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression ***Mol Med Today*, 2000: 6:149-56.**
85. Inoue K, Slaton JW, Perrotte P, et al. Interleukin-8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer ***Cancer Res.*, 2000;60: 2290-9.**
86. Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, et al. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. ***Cell.* , 1998: 92:391-400.**
87. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, et al. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficiente mice. ***Cancer Res.*, 1998: 58:1048-51.**
88. Wilhelm SM, Colloier IE, Kronberger A et al. Human skin fibroblaststromelysin: structure, glycosylatiion, substrate specifty and differential expression in normal and tumorigenic cells. ***Proc Natl Acad Sci EEUU*, 1987: 84:6725-9.**
89. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, Steeg PS. Cancer invasion and metastasis positive and negative regulatory elements ***Cancer Invest.* , 1991: 9:543-51.**
90. Salowe SP, Marcy AL, Cuca GC et al. Characterization of zinc-binding sites in human stromelysin-1. stoichiometry of the catalytic domain and identification of a cysteine ligand in the proenzyme. ***Biochemistry.*, 1992: 31:1263-9**
91. Bode W, Reinemer P, Huber R, et al. The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a

- substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity. *Embo J*, 1994; 13:1263-9.
92. Nakajima M, Welch DR, Belloni PN, et al. Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials *Cancer Res.* , 1987; 47:4869-76.
  93. Nakajima M, Lotan D, Baig MM, et al. Inhibition by retinoic acid of type IV collagenolysis and invasion through reconstituted basement membrane by metastatic rat mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* , 1989; 49:1698- 706.
  94. Matrisian LM, Bowden GT. Stromelysin/transin and tumor progression. *Semin Cancer Biol.* , 1990: 1:107-15.
  95. Jr., Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J.* , 1991: 5:2145-54.
  96. Gioia M, Monaco S, Fasciglione GF, et al. Characterization of the mechanisms by which gelatinase A, neutrophil collagenase, and membrane-type metalloproteinase MMP-14 recognize collagen I and enzymatically process the two alpha -chains. *J Mol Biol.*, 2007: 368:1101-3.
  97. Littlepage LE, Sternlicht MD, Rougier N, et al. Matrix metalloproteinases contribute distinct roles in neuroendocrine prostate carcinogenesis, metastasis, and angiogenesis progression. *Cancer Res.*, 2010: 70:2224-34.
  98. Offersen BV, Knap MM, Horsman MR, et al. Matrix metalloproteinase-9 measured in urine from bladder cancer patients is an independent prognostic marker of poor survival *Acta Oncol.* , 2010: 49:1283-7.
  99. Min C, Eddy SF, Sherr DH, et al NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *J Cell Biochem.* , 2008: 104:733-44.

100. Wågsäter D, Zhu C, Björkegren J, et al. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr(-/-)Apob(100/100) mouse. **Int J Mol Med.**, 2011: 28:247–53.
101. Linask KK, Han M, Cai DH, et al. Cardiac morphogenesis: matrix metalloproteinase coordination of cellular mechanisms underlying heart tube formation and directionality of looping. **Dev Dyn.**, 2005: 233:739–53.
102. Fainardi E, Castellazzi M, Tamborino C et al. Potential relevance of cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal synthesis of active matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as markers of disease remission in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*, 2009: 15:547-54.
103. Van Vollenhoven. RF Unresolved issues in biologic therapy for rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol.** , 2011: 7:205–15.
104. Chen EI, Li W, Godzik A, et al. «A residue in the S2 subsite controls substrate selectivity of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem*, 2003: 278:17158-63.
105. Rosenblum G, Meroueh S, Toth M, et al. Molecular structures and dynamics of the stepwise activation mechanism of a matrix metalloproteinase zymogen: challenging the cysteine switch dogma. **J Am Chem Soc.**, 2007: 129:13566–74.
106. Turpeenniemi-Hujanen. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. **Biochimie**, 2005: 87:287–97.
107. Zijlstra A, Seandel M, Kupriyanova TA, et al. Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory chemokines during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. **Blood**, 2006: 107: 317-2.

108. Stetler-Stevenson WG . Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent activities. *Sci Signal.* , 2008: 1:re6.
109. Monteagudo C, Merino MJ, San-Juan J, et al. Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign, and malignant breast tissue. *Am J Pathol.* , 1990: 136:585-92
110. D'Errico A, Garbisa S, Liotta LA, et al. Augmentation of type IV collagenase, laminin receptor, and Ki67 proliferation antigen associated with human colon, gastric, and breast carcinoma progression. *Mod Pathol.* , 1991: 4:239-46
111. Davies B, Miles DW, Happerfield LC et al. Activity of tipe IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer.* , 1993: 67:1126-31.
112. Stearns ME, Wang M. Type IV collagenase (M(r) 72,000) expression in human prostate: benign and malignant tissue. *Cancer Res.*, 1993: 53:878-83.
113. Bianco FJ Jr, Gervasi DC, Tiguert R, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in bladder washes from bladder cancer patients predicts pathological stage and grade. *Clin Cancer Res.*, 1998: 4 3011-6.
114. Karran EH, Young TJ, Markwell RE, et al. In vivo model of cartilage degradation-effects of a matrix metalloproteinase inhibitor. *Ann Rheum Dis.*, 1995: 54:662-9.
115. Brown S, Bernardo MM, Li ZH, et al. Potent and selective mechanism-based inhibition of Gelatinases. *J Am Chem Soc*, 2000: 122:6799-800.
116. Jones JL, Walker RA. Control of matrix metalloproteinase activity in cancer. *J Pathol* , 1997: 183: 377–379.
117. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression *Nat Rev Cancer*, 2002: 2:161–174

118. FJ Vizoso, LO Gonzalez MD Corte, JC Rodriguez, J Vazquez, ML Lamelas, Junquera. «Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *British Journal of Cancer*, 2007: 96, 903 – 911.
119. Chantrain CF, Shimada H, Jodele S, Groshen S, Ye W, Shalinsky DR, Werb,Z, Coussens LM, DeClerck YA. Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment. *Cancer Res* , 2009: 64: 1675–1686
120. Li HC, Cao DC, Liu Y, Hou YF, Wu J, Lu JS, Di GH, Liu G, Li FM, Ou ZL, Jie C, Shen ZZ, Shao ZM. 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.
121. Nakopoulou L, Tsimpa I, Alexandrou P, Louvrou A, Ampela C, Markaki S,Davaris PS. MMP-2 protein in invasive breast cancer and the impact of MMP-2/TIMP-2 phenotype on overall survival. . *Breast Cancer Res Treat* 77: 145–155, 2003: 77: 145–155.
122. Hirvonen R, Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in T(1–2)N0 breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* , 2003: 77: 85– 91.
123. Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *Br J Cancer*, 2003: 89: 1270–1275
124. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* , 2001: 411: 375–379.
125. Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res*, 2000: 6: 4823–4830.
126. 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

127. Prybylowska K, Kluczna A, Zadrozny M, Krawczyk T, Kulig A, Rykala J, Kolacinska A, Morawiec Z, Drzewoski J, Blasiak J. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. ***Breast Cancer Res Treat***, 2006; 95: 65–72.
128. Jian WG, Davies G, Martin TA, Parr CH, Watkins G, Mason MD, Mokbel K, Mansel RE. Targeting matrilysin and its impact on tumor growth in vivo: the potential implications in breast cancer therapy. ***Clinical Cancer Res***, 2005; 11: 6012–6019.
129. Wang F, Reierstad S, Fishman DA. Matrilysin over-expression in MCF-7 cells enhances cellular invasiveness and pro-gelatinase activation. ***Cancer Lett***, 2006; 236: 292–301.
130. 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.
131. 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
132. Knauper V, Cowell S, Smith B, Lopez-Otin 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.
133. Nielsen BS, Rank F, Lopez JM, Balbin M, Vizoso F, Lund LR, Dano K, Lopez-Otin C. Collagenase-3 expression in breast myofibroblasts as a molecular marker of transition of ductal carcinoma in situ lesions to invasive ductal carcinomas. ***Cancer Res***, 2001; 61: 7091–7100.

134. Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. . *J Biol Chem* , 1996: 271: 1544– 1550.
135. 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.
136. 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
137. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* , 2002: 21: 2245–2252.
138. Spurbeck WW, Ng CY, Strom TS, Vanin EF, Davidoff AM. Enforced expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 affects functional capillary morphogenesis and inhibits tumor growth in a murine tumor model. .*Blood* , 2002: 100: 3361–3368.
139. Kotzsch M, Farthmann J, Meye A, Fuessel S, Baretton G, Tjan-Heijnen VC, Schmitt M, Luther T, Sweep FC, Magdolen V, Span PN Prognostic relevance of uPAR-del4/5 and TIMP-3 mRNA expression levels in breast cancer. *Eur J Cancer*, 2005: 41: 2760–2768.
140. Span PN, Lindberg RL, Manders P, Tjan-Heijnen VC, Heuvel JJ, Beex LV, Sweep CG. Tissue inhibitors of metalloproteinase expression in human breast cancer: TIMP-3 is associated with adjuvant endocrinotherapy success. *J Pathol* , 2004: 202: 395–402
141. Wiseman BS, Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science*, 2002: 296: 1046–1049.
142. Sloane BF, Yan S, Podgorski I, Linebaugh BE, Cher ML, Mai J, Cavallo-Medved D, Sameni M, Dosescu J, Moin K. Cathepsin B and

- tumor proteolysis: contribution of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol*, 2005; 15: 149–157
143. Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, Siemes S, Trumper L, Binder C. « Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103: 5454–5459.
  144. Queen MM, Ryan RE, Holzer RG, Keller-Peck CR, Jorcyk CL. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Res*, 2005; 65: 8896–8904.
  145. Fernandez-Gomez J, Safwan Escaf, Luis-Ovidio Gonzalez, Aurelio Suarez, Salome Gonzalez-Reyes, Jose González, Oscar Miranda & Francisco Vizoso. Relationship between metalloprotease expression in tumour and stromal cells and aggressive behaviour in prostate carcinoma: Simultaneous high-throughput study of multiple metalloproteases and their inhibitors using tissue array analysis of radical prostat. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 2011: Volume 45, Issue 3.
  146. 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.
  147. Escaff S, Fernández JM, González LO, Suárez A, González-Reyes S, González 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 Oct;29(5):657-63.
  148. Massova I, Kotra LP, Fridman R, et al. Matrix metalloproteinases: structures, evolution and diversification *Faseb J*, 1998; 12:1075-95.

149. Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, Mottet N, Schmid HP, van der Kwast T, Wiegel T, Zattoni F. «Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, Mottet N, Schmid HP, van der EAU guidelines on prostate cancer.» *Eur Urol.*, 2011
150. *American Joint Committee on Cancer Staging.* , de Cooper IS, Hemson DE. Fleming ID, 219-22. Philadelphia: JB Lippincott. , 1997.
151. González LO, González-Reyes S, Marín L, González L, González JM, Lamelas ML, Merino AM, Álvarez E, Pidal I, del Casar JM, Comparative analysis and clinical value of the expression of metalloproteases and their inhibitors intratumor stromal mononuclear inflammatory cells and those ones at the invasive front of breast carcinomas. 2010 **Histopathology 2010, 862-76.**
152. González LO, P. I. Overexpression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in mononuclear inflammatory cells in breast cancer correlates with metastasis-relapse. **2007 Br J Cancer , p. 957-963.**
153. de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J, Miyano S, Open source clustering software. **Bioinformatics, 2004. 20(9): p. 1453-4.**
154. Cózar JM, B. Miñana B., Gómez-Veiga F., Rodríguez-Antolín A. Villavicencio H et al. Registro nacional de cáncer de próstata 2010 en España. **Actas Urol Esp. 2013;37:12---9.**
155. Sanchis-Bonet A, Arribas-Gomez, Sanchez-Rodriguez 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. doi: 10.1016/j**
156. Harvey P, Bauita A Enderlsby D, Curtis B. Lacovidou A Walker M. A systematic review of the diagnostic accuracy of prostate specific antigen. *BMC Urol* 2009; 9:14antigen. *BMC Urol* 2009; 9:14
157. Vickers AJ, Ulmert D, Sjoberg DD et al. 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 346, f2023 (2013).**

158. [Andriole GL, Crawford ED, Grubb III RL, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. N Engl J Med 2009; 360:1310–9.](#)
159. [Loeb S, Carter HB, Berndt SI, Ricker W, Schaeffer EM. Complications after prostate biopsy: data From SEER-Medicare. J Urol 2011;186, 1830–4.](#)
160. [Burford DC, Kirby M, Austoker A. Prostate cancer risk management programme information for primary care; PSA testing in asymptomatic men. evidence document. NHS Cancer Screening Programmes, 2010 143-213.](#)
161. [Nam RK, Saskin R, Lee Y, et al. Increasing hospital admission rates for urological complications after transrectal ultrasound guided prostate biopsy. J Urol 2013;189: S12–8.](#)
162. [Auprich M, Chun FK, Ward JF, et al. Critical assessment of preoperative urinary prostate cancer antigen 3 on the accuracy of prostate cancer staging. Eur Urol 2011;59:96–105.](#)
163. [de la Taille A, Irani J, Graefen M, et al. Clinical evaluation of the PCA3 assay in guiding initial biopsy decisions. J Urol 2011;185: 2119–25.](#)
164. [Nakanishi H, Groskopf J, Fritsche HA, et al. PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: implication in selecting candidates for active surveillance. J Urol 2008;179: 1804–9, discussion 1809–10.](#)
165. [Ploussard G, Durand X, Xylinas E, et al. Prostate cancer antigen 3 score accurately predicts tumour volume and might help in selecting prostate cancer patients for active surveillance. Eur Urol 2011;59:422–9.](#)
166. [Parekh D., Punnen S., Sjoberg D., Asroff S., Bailen J., Cochran J., A Multi-institutional Prospective Trial in the USA Confirms that the 4Kscore Accurately Identifies Men with High-grade Prostate Cancer. Eur Urol 2015; 68, 464 – 470.](#)
167. [Hori S, Blanchet J-S, McLoughlin J. From prostate-specific antigen \(PSA\) to precursor PSA \(proPSA\) isoforms: a review of the emerging role of proPSAs in the detection and management of early prostate cancer. BJU Int 2013;112: 717–28.](#)

Con formato	... [23]
arc24638 29/9/15 8:00	
Con formato	... [24]
arc24638 29/9/15 8:01	
Con formato	... [25]
arc24638 29/9/15 8:03	
Eliminado: <#>	
arc24638 29/9/15 8:03	
Con formato	... [26]
arc24638 29/9/15 8:03	
Con formato	... [27]
arc24638 29/9/15 8:03	
Movido (inserción) [1]	... [28]
arc24638 29/9/15 8:04	
Con formato	... [29]
arc24638 29/9/15 8:06	
Eliminado:	
arc24638 29/9/15 8:06	
Movido (inserción) [2]	... [30]
arc24638 29/9/15 10:01	
Con formato	... [31]
arc24638 29/9/15 8:06	
Eliminado:	
arc24638 29/9/15 8:06	
Con formato	... [32]
arc24638 29/9/15 8:06	
Eliminado:	
arc24638 29/9/15 8:06	
Con formato	... [33]
arc24638 29/9/15 8:06	
Eliminado: <#>	
arc24638 29/9/15 8:07	
Con formato	... [34]
arc24638 29/9/15 8:06	
Eliminado:	
arc24638 29/9/15 8:06	
Eliminado: <#>	
arc24638 29/9/15 8:07	
Con formato	... [35]
arc24638 29/9/15 8:09	
Eliminado:	
arc24638 29/9/15 8:07	
Con formato	... [36]
arc24638 29/9/15 8:09	
Con formato	... [37]
arc24638 29/9/15 8:12	
Movido (inserción) [3]	... [38]
arc24638 29/9/15 8:12	
Con formato	... [39]
arc24638 29/9/15 8:12	
Eliminado: UR	
arc24638 29/9/15 8:12	
Con formato	... [40]
arc24638 29/9/15 8:12	
Eliminado: ROL	
arc24638 29/9/15 8:12	
Con formato	... [41]
arc24638 29/9/15 8:13	
Eliminado:	
arc24638 29/9/15 8:13	
Con formato	... [42]
arc24638 29/9/15 8:13	
Movido (inserción) [4]	... [43]
arc24638 29/9/15 8:14	
Con formato	... [44]
arc24638 29/9/15 8:13	
Con formato	
arc24638 29/9/15 8:14	
Con formato	... [45]

168. [Catalona WJ, Partin AW, Sanda MG, et al. A multicenter study of \[-2\]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. \*J Urol\* 2011;185: 1650-5.](#)
169. [Lazzeri M, Briganti A, Scattoni V, et al. Serum index test % \[-2\]proPSA and Prostate Health Index are more accurate than prostate specific antigen and % fPSA in predicting a positive repeat prostate biopsy. \*J Urol\* 2012;188: 1137-43.](#)
170. [Nordstro T, Vickers A, Assel M, Lilja H, Gronberg H., Eklund M. Comparison Between the Four-kallikrein Panel and Prostate Health Index for Predicting Prostate Cancer. \*Eur urol\* 2015, 68: 139 – 146](#)
171. [Lane BR, Zippe CD, Abouassaly R, Schoenfield L, Magi-Galluzzi C, Jones JS. Saturation technique does not decrease cancer detection during followup after initial prostate biopsy. \*J Urol\* 2008;179: 1746-50.](#)
172. [Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, Brendler CB. Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable \(stage T1c\) prostate cancer. \*JAMA\* 1994;271:368-74.](#)
173. [Schoots I., Roobol M., Nieboer D, Bangma C., Steyerberg E., Hunink, Magnetic Resonance Imaging-targeted Biopsy May Enhance the Diagnostic Accuracy of Significant Prostate Cancer Detection Compared to Standard Transrectal Ultrasound-guided Biopsy: A Systematic Review and Meta-analysis \*Eur Urol\* 2015; 68, 438 – 450.](#)
174. [Cooperberg MR, Hilton JF, Carroll PR. The CAPRA-S score: a straightforward tool for improved prediction of outcomes after radical prostatectomy. \*Cancer\* 2011; 117: 5039-46.](#)
175. [Cooperberg MR, Davicioni E, Crisan A, Jenkins R., Ghadessi M., Karnes R J. Combined Value of Validated Clinical and Genomic Risk Stratification Tools for Predicting Prostate Cancer Mortality in a High-risk Prostatectomy Cohort. \*Eur Urol\*; 2015; 67: 326 – 333](#)
176. [Joniau S., Briganti A., Gontero P., Gandaglia G., Tosco L., Fieuws S., Tombal B., Marchioro G., Walz J. g, Burkhard Kneitz B., Bader P., Frohneberg D., Tizzani A., Graefen M., van Cangh P., Karnes J., Montorsi F., Van Poppel H., Spahn M. Stratification of High-risk](#)

arc24638 29/9/15 8:13  
Eliminado: <#> .

a:c24638 29/9/15 8:14  
Con formato ... [46]

arc24638 29/9/15 8:15  
Eliminado: .

arc24638 29/9/15 8:14  
Con formato ... [47]

arc24638 29/9/15 8:15  
Movido (inserción) [5] ... [48]

arc24638 29/9/15 8:15  
Con formato ... [49]

arc24638 29/9/15 8:17  
Eliminado: .

arc24638 29/9/15 8:16  
Con formato ... [50]

arc24638 29/9/15 8:17  
Con formato ... [51]

arc24638 29/9/15 8:19  
Movido (inserción) [6] ... [52]

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [53]

arc24638 29/9/15 8:21  
Eliminado: .

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [54]

arc24638 29/9/15 8:21  
Movido (inserción) [7] ... [55]

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [56]

arc24638 29/9/15 8:21  
Eliminado: <#> . ... [57]

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [58]

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [59]

arc24638 29/9/15 8:21  
Eliminado: M, .

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [60]

arc24638 29/9/15 8:25  
Eliminado: .

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [61]

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [62]

arc24638 29/9/15 8:28  
Con formato ... [63]

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [64]

arc24638 29/9/15 8:28  
Movido (inserción) [8] ... [65]

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [66]

- Prostate Cancer into Prognostic Categories: A European Multi-institutional Study. *Eur Urol* 2015; 67: 157 -164.
177. Escaff S., Fernández JM., González L., Suárez A., González-Reyes S., González 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 DOI 10.1007/s00345-010-0595-6
178. Santos BL, Oliveira MN, Coelho PL, Pitanga BP, da Silva AB, Adelita T, Silva VD, Costa MF, El-Bachá RS, Tardy M, Chneiweiss H, Junier MP, Moura-Neto V, Costa SL. Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. *Chem Biol Interact.* 2015 Sep 22. S0009-2797(15)30028-4. doi: 10.1016/j.cbi.2015.07.014
179. Eiró N, González L, González LO, Fernandez-Garcia B, Lamelas ML, Marín L, González-Reyes S, del Casar JM, Vizoso FJ. Relationship between the inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development. *PLoS One.* 2012;7(11):e49047. doi: 10.1371/journal.pone.0049047
180. Mylona E, Kapranou A, Mavrommatis J, Markaki S, Keramopoulos A and Nakopoulou L, The multifunctional role of the immunohistochemical expression of MMP-7 in invasive breast cancer. *APMIS*, 2005. 113: p. 246-255.
181. Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC and Pauli BU, The breast cancer beta 4 integrin and endothelial human CLCA2 mediate lung metastasis. *J Biol Chem*, 2001. 276: p. 25438-25446.
182. Jiang WG, Davies G, Martin TA, Parr C, Watkins G, Mason MD, Mokbel K and Mansel RE, Targeting matrilysin and its impact on tumor growth in vivo: the potential implications in breast cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 2005. 11: p. 6012-6019.
183. Wang F, Reierstad S and Fishman DA, Matrilysin over-expression in MCF-7 cells enhances cellular invasiveness and pro-gelatinase activation. *Cancer Lett*, 2006. 236: p. 292-301.

arc24638 29/9/15 8:32  
Eliminado: -

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato: Fuente: (Predeterminado) Arial, 12 pt, Negrita, Inglés (americano)

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato: Fuente: Sin Negrita

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato: Fuente: (Predeterminado) Arial, 12 pt, Inglés (americano)

arc24638 29/9/15 8:31  
Movido (inserción) [9]

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato: Fuente: (Predeterminado) Arial, Color de fuente: Automático

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato: Color de fuente:

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [67]

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato: Color de fuente:

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [68]

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [69]

arc24638 29/9/15 8:33  
Eliminado: -

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato: Fuente: Negrita

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [70]

arc24638 29/9/15 8:33  
Movido (inserción) [10]

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [71]

arc24638 29/9/15 8:33  
Con formato ... [72]

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [73]

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato: Fuente: 12 pt, Negrita

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [74]

arc24638 29/9/15 8:35  
Eliminado: -

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [75]

arc24638 29/9/15 8:35  
Movido (inserción) [11]

arc24638 29/9/15 8:35  
Con formato ... [76]

arc24638 29/9/15 11:13  
Con formato ... [77]

arc24638 29/9/15 8:42  
Eliminado: <#> -

184. Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J and Lopez-Otin C, *Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas.* **J Biol Chem, 1994. 269: p. 16766-16773.**
185. Knauper V, Cowell S, Smith B, Lopez-Otin C, O'Shea M, Morris H, Zardi L and 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: p. 7608-7616.**
186. González LO, Pidal I, Junquera S, y cols, *Overexpression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in mononuclear inflammatory cells in breast cancer correlates with metastasis-relapse.* **Br J Cancer, 2007. 97: p. 957-963.**