

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio del gen *PCA3* en el diagnóstico del cáncer de próstata**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Natalia Rodón Font**

Directores

María Luisa Maestro

Javier Puig

Antonio M. Ballesta

**Madrid, 2014**

# **ESTUDIO DEL GEN *PCA3* EN EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.**

**Natalia Rodón Font**

Tesis Doctoral

Universidad Complutense de Madrid

## **DIRECTORES**

**Dra. M<sup>a</sup> Luisa Maestro**

Dra. Ciencias Biológicas  
Facultativo Especialista  
Hospital Clínico San Carlos

**Dr. F. Javier Puig**

Doctor en Medicina  
Director Médico  
**BIOPAT**  
Biopatología Molecular S.L.  
Grup Assistència

**Dr. Antonio M Ballesta**

Doctor en Medicina  
Director Médico Analiza  
S. Análisis Clínicos  
Hospital Universitario  
Moncloa

**HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS**

**BIOPAT. BIOPATOLOGÍA MOLECULAR S.L.**

**GRUP ASSISTÈNCIA**

**ANALIZA. HOSPITAL MONCLOA**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**



**ESTUDIO DEL GEN *PCA3* EN EL DIAGNÓSTICO DEL  
CÁNCER DE PRÓSTATA**

**NATALIA RODÓN FONT**

Madrid 2014



Dra. **Maria Luisa Maestro de las Casas**, Doctora en CC. Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid.

Dr. **Fco. Javier Puig Torrus**, Doctor en Medicina por la Universidad de Barcelona.

Dr. **Antonio M. Ballesta Gimeno**, Doctor en Medicina por la Universidad de Cádiz.

**INFORMAN:**

Que la tesis titulada: "**Estudio del gen PCA3 en el diagnóstico del cáncer de próstata.**", de la que es autora Dña. **Natalia Rodón Font**, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Barcelona, ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple las condiciones exigidas para ser presentada a efectos de ser juzgada.

**Madrid, a 2 de julio de 2014.**

Fdo. Dra. Maestro

Fdo. Dr. Puig

Fdo. Dr. Ballesta



**A mis padres y a mi hermana.**

**A mi hija Nàdia.**



## **AGRADECIMIENTOS**



En primer lugar quiero darle las gracias al Dr. Xavier Puig, mi director de tesis, mentor y jefe. Este trabajo no existiría si no me hubiera dado la oportunidad de trabajar en su grupo. Gracias por enseñarme tanta anatomía patológica y tanta biología molecular, y por no permitir que se olvide jamás que detrás de cada eppendorff hay un paciente esperando un diagnóstico o un tratamiento. Gracias por guiar y corregir este trabajo, por exigirme siempre más y por confiar en mí.

Gracias a mis otros dos directores, Dra. M<sup>a</sup> Luisa Maestro y Dr. Antonio M Ballesta, por sus valiosas correcciones y sugerencias y por nuestros encuentros en Madrid.

Gracias al Dr. Ignacio Orce y a todos los miembros de los equipos directivos de Biopat (Grup Assitència) por su soporte en la realización de este proyecto.

Gracias a todo el equipo de Biopat, especialmente a la Dra. Ruth Román por corregir la tesis y por sus ánimos, a Eva Torija por darme aliento y un abrazo cuando más lo he necesitado, a la Dra. Beatriz García-Peláez, Olga Díaz, Gloria Biern y a mi queridísima Rafi Vizuite por darme siempre tantísimo cariño. A Cora Ferrer por ayudarme a medir los cerca de 1000 cilindros de tejido prostático de las biopsias.

Gracias a todo el equipo de Histopat, especialmente a Montse Verdú por ayudarme a buscar huecos en los que poder escribir, por los ánimos, el cariño y la terapia. A la Dra. Isabel Trias por revisar conmigo las biopsias, por las risas y por todo lo que me ha enseñado. A Montse Alcaraz, Cristina García, Ana Guardiola, Bego Martínez (Blanco y en botella...), Nuri Arraiza, Carme Pubill, Patri García, Vero Serrano, Sara Rivas y Vicens Montal.

Gracias al Dr. Josep M Banus y Dr. Arturo Domínguez del ICUN y al Dr. Calvo de la UB.

A mis amigos y antiguos compañeros de departamento de la Facultad de Biología, muy especialmente al Dr. Pedro Moral, por ayudarme en mis inicios, por regalarme tantos conocimientos y seguir siempre a mi lado. A mi queridísimo Dr. Emili González Pérez por aguantarme, aconsejarme, ayudarme y ser mi amigo. A la Dra. Esther Esteban, Dr. Marc Vía, Dr. Toni López, Dra. Mireia Esparza, Dra. Neus Martínez, Dr. Rolo González-José, a Andrew Shala y al Dr. Yorgos Athanasiadis.

A mis amigos del cole: Albert, Esther y Cristina, por animarme y estar ahí. A “las Tampax”, os añoro.

Gracias a Alejandra Bedós y Rafa Sala. Porque no sé qué habría sido de mi sin ellos. Por no dejar que me sintiera sola, animarme y por quererme tal cómo soy.

GRACIAS a toda mi familia; muy especialmente a mis padres: mi madre Queta y mi padre Tino por estar siempre a mi lado, por quererme tanto y ayudarme constantemente en todo. Por no darme siempre la razón y ayudarme a reconducir situaciones imposibles. Por vuestro apoyo incondicional y por hacer que me sienta tan querida.

A una de las personas clave en mi vida, mi hermana Anna, por estar siempre a mi lado, por no juzgarme, por ayudarme tanto, por calmarme y ofrecerme distintas perspectivas de situaciones angustiosas. Por nuestras risas, nuestras charlas y discusiones. Por ser imprescindible. ¡Te quiero mucho hermanita!

A mi hermano Tino, por estar siempre a mi lado. A Esther, Lucía, Marc y Bru. A mi abuelo Vicente porque todo empezó hablando con él hace más de 20 años. A mi iaia Coral, a Maqui y a Valentí. A mi queridísima y añorada Carlota y a Víctor.

A David, por ser mi cantante preferido, por tanto amor y por devolverme la alegría. A Mimi por las fantásticas comidas del fin de semana, a Georgina y Amanda por ser maravillosas.

Gratitud infinita a mi hija **Nàdia**, por su paciencia y comprensión, por regalarme su tiempo y su compañía, por animarme siempre a escribir un poquito más. Por los cientos de post-it que me ha ido dejando por casa: “mami, escriu la tesi, tú pots fer-ho”; “ánims! Pots acabar la tesi! T'estimo!”. Gracias por ser maravillosa. Eres lo mejor de mi vida y las palabras no bastan para expresar cuantísimo te quiero.

Finalmente, gracias a los pacientes que con su generosidad permiten que estos trabajos existan y a todas las personas que en algún momento se han cruzado en mi camino y forman parte también de esta historia.



## ÍNDICES



**Índice de contenidos**

<b>1</b>	<b>RESUMEN EN CASTELLANO .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>RESUMEN EN INGLÉS.....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>45</b>
3.1	LA PRÓSTATA.....	47
3.1.1	ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y FUNCIÓN.....	47
3.1.2	PATOLOGIA DE LA PROSTATA .....	53
3.1.2.1	PROSTATITIS .....	53
3.1.2.2	HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA.....	56
3.1.2.3	LESIONES PREMALIGNAS.....	58
3.2	CÁNCER DE PRÓSTATA.....	61
3.2.1	SINTOMATOLOGÍA.....	61
3.2.2	EPIDEMIOLOGÍA .....	62
3.2.3	FACTORES DE RIESGO .....	64
3.2.4	MECANISMOS MOLECULARES .....	69
3.2.5	PATOLOGÍA DEL ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA.....	73
3.2.5.1	GRADO DE GLEASON.....	79
3.3	DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO PRECOZ DEL CARCINOMA DE PRÓSTATA: PROTOCOLO DE CRIBADO .....	86
3.3.1	EL ANTIGENO PROSTATICO ESPECÍFICO (PSA).....	86
3.3.2	EL TACTO RECTAL.....	88
3.4	PROBLEMÁTICA EN DISCUSIÓN DEL CRIBADO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA: SOBREDIAGNÓSTICO Y SOBRETREATAMIENTO .....	89
3.5	EL GEN <i>PCA3</i> .....	98
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>103</b>
4.1	OBJETIVOS .....	105
<b>5</b>	<b>PACIENTES Y MÉTODOS.....</b>	<b>107</b>
5.1	DISEÑO DEL ESTUDIO.....	109
5.2	PACIENTES .....	110
5.3	RECOGIDA DE MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DE S- <i>PCA3</i> .....	111
5.4	DETERMINACIÓN E INTERPRETACIÓN DEL SCORE DE <i>PCA3</i> .....	112
5.5	PROTOCOLO DE REALIZACIÓN DE LA BIOPSIA PROSTÁTICA .....	130
5.6	ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO .....	131
5.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	134

<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>141</b>
6.1	DESCRIPCIÓN DE LA SERIE .....	143
6.2	ANÁLISIS DEL s-PCA3.....	145
6.2.1	<i>RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y VARIABLES CONTÍNUAS .....</i>	<i>145</i>
6.2.2	<i>RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y VARIABLES CATEGÓRICAS.....</i>	<i>149</i>
<b>7</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>169</b>
7.1	DISCUSIÓN .....	171
7.1.1	<i>RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y EDAD DEL PACIENTE.....</i>	<i>172</i>
7.1.2	<i>RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y PSA (TOTAL Y LIBRE:TOTAL) .....</i>	<i>173</i>
7.1.3	<i>RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y VOLUMEN PROSTÁTICO .....</i>	<i>174</i>
7.1.4	<i>RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y PROSTATITIS.....</i>	<i>175</i>
7.1.5	<i>RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y BIOPSIA.....</i>	<i>176</i>
7.1.6	<i>RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y UN SOLO PARÁMETRO DE AGRESIVIDAD TUMORAL.....</i>	<i>178</i>
7.1.7	<i>RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y DOS PARÁMETROS DE AGRESIVIDAD TUMORAL.....</i>	<i>182</i>
7.1.8	<i>IDONEIDAD DEL s-PCA3 EVALUADA POR EXPERTOS.....</i>	<i>183</i>
7.2	LIMITACIONES DEL ESTUDIO .....	184
7.2.1	<i>LIMITACIONES EN LA REPRESENTATIVIDAD DE LA MUESTRA.....</i>	<i>184</i>
7.2.2	<i>LIMITACIONES EN EL PODER ESTADÍSTICO DE LA MUESTRA .....</i>	<i>185</i>
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>187</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>191</b>
<b>10</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>207</b>
<b>11</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>211</b>
11.1	ANEXO 1: IMPRESO DE SOLICITUD DE ESTUDIO DEL S-PCA3 .....	213
11.2	ANEXO 2: <i>RAW RUN REPORT S-PCA3</i> .....	217
11.3	ANEXO 3: RATIO REPORT PCA3 .....	225
11.4	ANEXO 4: INFORME DE RESULTADOS DEL S-PCA3 .....	229
11.5	ANEXO 5: COMUNICACIONES EN CONGRESOS.....	235
11.6	ANEXO 6: ARTÍCULO PUBLICADO.....	239

**Índice de figuras**

Figura 1: Localización anatómica de la próstata. (Modificado de(Netter 2011))..... 47

Figura 2: Localización anatómica de la próstata. Detalle de la sección frontal (izquierda) y sagital (derecha). (Modificado de (Netter 2011))..... 48

Figura 3: Sección transversal de la próstata que muestra los lóbulos en los que se divide. (Modificado de (Netter 2011))..... 49

Figura 4. Próstata adulta normal. Clasificación por zonas: zona central (CZ), zona periférica (PZ), zona de transición (TZ) y zona periuretral. (Modificado de (Vinay Kumar 2005))..... 50

Figura 5: Sección microscópica de parénquima prostático (Hematoxilina-Eosina. 400x)..... 51

Figura 6: Imagen microscópica de prostatitis granulomatosa (Hematoxilina-eosina 100X): en el estroma glandular se observa un granuloma con células histiocitarias epitelioides y centro necrótico, idéntico a los que pueden observarse en casos de tuberculosis..... 55

Figura 7: Tasas de incidencia de CaP estandarizadas por edad entre 1975 y 2012 (por cada 100.000 habitantes) en diferentes partes del mundo. (WHO 2014)..... 63

Figura 8: Incidencia del cáncer de próstata a nivel global. (Modificado de [www.prostatecancerprevention.net](http://www.prostatecancerprevention.net))..... 65

Figura 9: Gráfica típica (“Manhattan Plot”) de los resultados de un *Genome-Wide Association Study* en 3,425 casos de CaP y 3,290 controles afroamericanos (Haiman, et al. 2011). Cada punto representa la posición cromosómica de una variante genética y el  $-\log_{10}$  del p-valor que ha devuelto la prueba de su asociación con la enfermedad. .... 67

Figura 10: Comparación esquemática del modelo lineal de la progresión del CaP con el modelo de diversidad molecular. (Modificado de (WHO 2014))..... 70

Figura 11: La selección de focos clonales de células prostáticas cancerosas bien por terapia de privación de andrógenos o por insuficiencia de andrógenos en el entorno tumoral. (Modificado de (Merson, Yang, Brewer, Olmos, Eichholz, McCarthy, Fisher, Kovacs, Berney, Foster, Moller, Scardino, Cuzick, Cooper, Clark, et al. 2014))..... 73

Figura 12: Secciones de un carcinoma de próstata teñido con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica con los anticuerpos AMACR que muestra positividad citoplasmática y evidencia de negatividad con p63 y CK903 demostrativas de pérdida del estrato basal. (200X). .... 77

Figura 13: El diagrama original del grado de Gleason, dibujado por él, y su correspondencia con secciones tisulares teñidas con hematoxilina-eosina.....	80
Figura 14: Patrón de Gleason 1-2 (Hematoxilina-Eosina, 100X).....	81
Figura 15: Patrón de Gleason 3 (Hematoxilina-Eosina, 100X).....	82
Figura 16: Patrón de Gleason 4 (Hematoxilina-Eosina, 400X).....	82
Figura 17: Patrón Gleason 5 (Hematoxilina-Eosina, 400X).....	83
Figura 18: A y B, CaP con grado <i>Gleason</i> (3 + 3). C, CaP con grado <i>Gleason</i> (4 + 4). D, CaP con grado <i>Gleason</i> (4 + 3) (Hematoxilina-Eosina, 100X). .....	84
Figura 19: La gran mayoría de los pacientes de CaP o no son candidatos a vigilancia activa (VA) (azul) o potencialmente lo son, pero sin progresión de la enfermedad (rojo). Sólo el 30% de los candidatos a vigilancia activa tendrá progresión aparente (negro). Aún así, más del 90% de estos pacientes se someten de entrada a un tratamiento radical (Modificado de Rubin M et al., 2014, International Society of Urologic Pathology Meeting 2014).....	92
Figura 20: Estructura de la unidad de transcripción del <i>PCA3</i> . El exón 4 puede someterse a poliadenilación alternativa en tres posiciones diferentes (4a, 4b, y 4c) y por tanto dar lugar a tres transcritos de diferentes tamaños. En el 95% de los casos, el exón 2 se omite mediante splicing alternativo (Hessels and Schalken 2009).....	98
Figura 21: Patrones de expresión de ARNm de los genes <i>PCA3</i> y <i>PSA</i> de tejido prostático mediante Northern Blot. T=tejido tumoral, B=Hiperplasia Prostática Benigna, N= tejido normal, M= metástasis (Bussemakers, et al. 1999). .....	99
Figura 22: Análisis ROC ( <i>Receiver Operating Characteristic</i> ) basado en el s- <i>PCA3</i> y los niveles plasmáticos del <i>PSA</i> como índices diagnósticos del CaP. La línea del s- <i>PCA3</i> se encuentra más alejada del modelo nulo (Marks, et al. 2007).....	101
Figura 23: Esquema de la recogida de muestra de orina para la determinación de s- <i>PCA3</i> ( <a href="http://www.gen-probe.es">www.gen-probe.es</a> ).....	111
Figura 24: Representación de una micropartícula magnética y las secuencias de ARNm de captura (modificada de <a href="http://www.gen-probe.es">www.gen-probe.es</a> ).....	113
Figura 25: Esquema de la Transcripción Mediada por Transcripción (TMA) ( <a href="http://www.progensa.es">www.progensa.es</a> ).....	114
Figura 26: Esquema del ensayo de Protección de la Hibridación (HPA) (de <a href="http://www.progensa.es">www.progensa.es</a> ).....	115
Figura 27: Distribución e interpretación del s- <i>PCA3</i> (de <a href="http://www.gen-probe.es">www.gen-probe.es</a> ).....	117

Figura 28: Flujo de trabajo unidireccional en el laboratorio para la determinación del s-PCA3 con el kit ProgenSA PCA3 Assay (PC: ordenador personal; TCS: <i>Target Capture System</i> ; VAC: bomba de vacío; SB100: bloque térmico con agitación; Leader HC+: Luminómetro Leader HC+).	118
Figura 29: Fotografía del ordenador, el TCS (en el centro de la imagen) y el SB100 (a la derecha de la imagen) de la zona pre-amplificación de BIOPAT.	119
Figura 30: Reconstitución de los reactivos del kit ProgenSA PCA3 Assay (izquierda) y hoja de trabajo y muestras para el estudio de PCA3 (derecha).	120
Figura 31: PROGNSA Worklist Editor, Calibradores y Controles para PCA3 y PSA y Hoja de Trabajo con el registro de muestras que se analizan.	122
Figura 32: Rack con los TTUs, Target Capture Reagents, Calibradores y Controles para PCA3 y PSA.	123
Figura 33: SB100 con el rack de TTUs.	124
Figura 34: Base magnética TCS, bomba de vacío y estación de dispensación del tampón de lavado.	125
Figura 35: Dispensación de 1 mL de tampón de lavado a cada tubo de reacción.	126
Figura 36: Base magnética TCS con el rack de TTUs.	127
Figura 37: Zona de post-amplificación de BIOPAT con el SB100 (izquierda), el Luminómetro Leader HC+ (centro) y el ordenador (derecha).	128
Figura 38: Luminómetro Leader HC+ y software PROGNSA PCA3 Assay Software.	129
Figura 39: Representación esquemática de la próstata con mapa de biopsias y localización de los cilindros obtenidos y las claves que se les asigna.	131
Figura 40: Ejemplo de regresión lineal simple.	137
Figura 41: Diagramas de dispersión (Scatterplots) entre s-PCA3 y los valores continuos estudiados.	147
Figura 42: Distribución de los pacientes en función del s-PCA3 y la presencia/ausencia de prostatitis (sí/no).	150
Figura 43: Distribución de los pacientes en función del rango de s-PCA3 (según la nota de corte = 50 y 100) y el resultado de la biopsia posterior.	152
Figura 44: Distribución del porcentaje de los pacientes diagnosticados de CaP en función del s-PCA3 ( $35 \leq s\text{-PCA3} < 50$ ; $s\text{-PCA3} \geq 50$ ) y el porcentaje de cilindros afectados por tumor (nota de corte = 33%).	154

Figura 45: Distribución de los pacientes diagnosticados de CaP, en función del rango de s-PCA3 ( $35 \leq \text{s-PCA3} < 50$ ,  $50 \leq \text{s-PCA3} \leq 100$  y  $\text{s-PCA3} > 100$ ) y el grado de Gleason. .... 155

Figura 46: Distribución de los pacientes diagnosticados de CaP, en función del rango de s-PCA3 ( $35 \leq \text{s-PCA3} < 50$ , y  $\text{s-PCA3} \geq 50$ ) y el grado de Gleason..... 157

Figura 47: Representación del número de casos en función del s-PCA3, el grado de Gleason y el % de milímetros afectados por tumor. .... 158

Figura 48: Representación del número de casos en función del s-PCA3, el grado de Gleason y el porcentaje de cilindros afectados por tumor. .... 162

Figura 49: Representación del número de casos en función del s-PCA3, el grado de Gleason y el porcentaje de cilindros afectados por tumor. .... 165

**Índice de tablas**

Tabla 1: Relación de las variables clínico patológicas recogidas y estudiadas.....	135
Tabla 2: Indicaciones por las que se solicitó el estudio del s-PCA3.....	143
Tabla 3: Valor mediano y rango de las variables continuas estudiadas.....	144
Tabla 4: Resultados de la regresión lineal simple entre s-PCA3 y una serie de variables continuas.....	146
Tabla 5: Resultados de regresión de Spearman entre s-PCA3 y una serie de variables continuas.....	148
Tabla 6: Tabla de contingencia para las categorías dicotómicas de s-PCA3 y prostatitis.....	150
Tabla 7: Frecuencias observadas de s-PCA3 positivos en dos intervalos: 35-50 y $\geq$ 50, y el resultado de la biopsia posterior.....	152
Tabla 8: Frecuencias observadas de s-PCA3 positivos en dos intervalos: 35-100 y $\geq$ 100, y el resultado de la biopsia posterior.....	153
Tabla 9: Frecuencias observadas de s-PCA3 positivos en dos intervalos: 35-50 y $\geq$ 50, y el resultado de la biopsia posterior.....	154
Tabla 10: Tabla de frecuencias observadas de s-PCA3 en dos grupos de biopsias según el grado de Gleason.....	156
Tabla 11: Tabla de frecuencias observadas de s-PCA3 en dos grupos de biopsias según el grado de Gleason.....	157
Tabla 12: Descripción de los casos categorizados según porcentaje de milímetros afectados por el tumor, s-PCA3 y grado de Gleason.....	159
Tabla 13: Tabla de resultados del modelo log-lineal.....	160
Tabla 14: Descripción de los casos categorizados según el porcentaje de cilindros afectados por tumor, s-PCA3 y grado de Gleason.....	163
Tabla 15: Tabla de resultados del modelo log-lineal.....	164
Tabla 16: Descripción de los casos categorizados según % de cilindros afectados por el tumor, s-PCA3 y grado de Gleason.....	166
Tabla 17: Tabla de resultados del modelo log-lineal.....	167



# **1 RESUMEN EN CASTELLANO**



## INTRODUCCION

La generalización del análisis del Antígeno Prostático Específico (PSA) en suero para la detección precoz del adenocarcinoma de próstata ha generado un notable aumento en el número de biopsias prostáticas, no obstante la baja especificidad del PSA genera un volumen importante de indicaciones de biopsia en pacientes con patologías benignas. Alrededor del 75% de las biopsias resultan negativas. En el grupo de pacientes con valores de PSA alterados pero no superiores a 10 ng/ml, lo que se conoce como la “zona gris” del diagnóstico, se mezclan pacientes con hiperplasia benigna prostática (HBP), prostatitis y adenocarcinoma de próstata. En los dos primeros casos, la biopsia será negativa y lo será repetidamente si las cifras de PSA persisten. En el tercer caso, los pacientes son diagnosticados de adenocarcinoma de próstata pero, en muchos casos, se trata de carcinomas de dudosa significación clínica y en pacientes de edad avanzada. En este contexto, el tratamiento quirúrgico radical no necesariamente modifica la esperanza de vida del paciente. En revisiones de series de autopsias se reporta el hallazgo incidental de adenocarcinoma de próstata oculto en el 40% de los pacientes mayores de 60 años y en el 60% a partir de los 80 años. Estas neoplasias no producen sintomatología ni comprometen la vida del paciente, pero son capaces de elevar el PSA sérico y desencadenar el protocolo clínico de biopsia y tratamiento quirúrgico. Actualmente existe consenso sobre la problemática que genera el cribado del adenocarcinoma de próstata con PSA y se consideran más relevantes los inconvenientes que genera que los beneficios en términos de reducción de la mortalidad. La agencia norteamericana de medicina preventiva (U.S. Preventive Services Task Force) ha publicado recientemente una recomendación de grado D en la que desaconseja el cribado de adenocarcinoma de próstata con PSA y ha suscitado reflexiones y discusiones en múltiples artículos posteriores, que reflejan la necesidad de replantear los protocolos actuales de cribado, diagnóstico y tratamiento del adenocarcinoma de próstata y profundizar en la búsqueda de nuevos biomarcadores específicos y predictivos de esta neoplasia.

El gen PCA3, ampliamente estudiado en los últimos años, es probablemente uno de los primeros biomarcadores que se encuentra ya en fase de aplicación clínica. Este

gen, localizado en el cromosoma 9q21-22, se transcribe exclusivamente en tejido prostático y se sobreexpresa intensamente en tejido prostático maligno en comparación con el benigno o normal adyacente (Bussemakers, et al. 1999). A diferencia del PSA, la sobreexpresión de PCA3 es específica de adenocarcinoma de próstata e independiente del volumen prostático y de la presencia de HBP. Desde el año 2006 se comercializa un kit diagnóstico de aplicación clínica para la detección de los niveles de ARNm del gen PCA3 en muestras de orina recogidas tras masaje prostático, con el que se obtiene un *score* de PCA3 (s-PCA3).

Un metaanálisis publicado en 2010, atribuye al PCA3 un valor predictivo negativo del 87.8-98%, reconociendo unos índices de validez diagnóstica aceptables para su uso en el diagnóstico de adenocarcinoma de próstata. El test, por otra parte, es de fácil implementación tanto en el protocolo clínico como en el laboratorio. Desde los primeros estudios efectuados se puso de manifiesto una relación directamente proporcional entre el s-PCA3 y el porcentaje de biopsias positivas posteriores. En alguno de los estudios más recientes se ha identificado también relación entre el s-PCA3 y diferentes determinantes de agresividad tumoral como el grado de Gleason, el volumen de tumor y la invasión extracapsular. La Asociación Europea de Urología en sus guías de 2010 contempla el uso de biomarcadores complementarios al PSA, entre los que destaca el PCA3 por su mayor especificidad y sensibilidad.

En el presente trabajo se analiza el impacto de la introducción del PCA3 en el manejo clínico de pacientes con PSA alterado, con especial atención en la reducción de la indicación de biopsias prostáticas y en su presunta capacidad predictiva de agresividad tumoral en pacientes ya diagnosticados de adenocarcinoma de próstata.

## **MATERIAL Y METODOS**

Se realizó un estudio observacional, prospectivo y multicéntrico de pacientes con sospecha de adenocarcinoma de próstata candidatos a biopsia de próstata. Se estableció un protocolo de indicaciones con consentimiento informado y sometido a un Comité de ética.

## MUESTRAS Y PACIENTES

Se incluyeron en el estudio 670 muestras de orina post-masaje prostático correspondientes a 598 pacientes consecutivos que acudieron a la consulta del urólogo entre octubre de 2009 y noviembre de 2012. A 66 pacientes se les estudiaron diferentes muestras de orina a lo largo de su seguimiento clínico. Para los análisis estadísticos comparativos con otros parámetros clínicos (edad, tasa de PSA sérico, presencia de prostatitis y volumen prostático) se utilizó únicamente el último estudio de PCA3, excluyendo los previos. Esto supuso la exclusión de 72 muestras. Todos los pacientes cumplían alguno de los siguientes criterios: PSA elevado y biopsia previa negativa, PSA alterado pero inferior a 10 ng/ml sin biopsia previa, PSA alterado y patología benigna prostática conocida (Prostatitis, HBP) y PSA elevado en pacientes con comorbilidad asociada a mayor riesgo en la práctica de biopsia. Se excluyeron los pacientes con diagnóstico previo de adenocarcinoma de próstata.

Se registraron la edad, el valor de PSA total (ng/ml), Índice de PSA, la presencia de prostatitis y/o HBP y el volumen prostático (cc) de los pacientes incluidos. En los casos en que se realizó la biopsia se registraron el número de cilindros obtenidos y los milímetros de tejido en la biopsia. Cuando se diagnosticó un adenocarcinoma de próstata se registraron el número de cilindros afectados, el porcentaje de tumor (en milímetros) y el grado de Gleason.

## DETERMINACION DE PCA3

Se recolectó la primera orina emitida tras un tacto rectal con masaje prostático, consistente en tres palpaciones por lóbulo, y se determinó el s-PCA3 con el kit ProgenSA™PCA3Assay (Gen-Probe). Mediante la cuantificación de ARNm de PCA3 y PSA se calculó un s-PCA3 según la fórmula:  $(\text{ARNm PCA3} / \text{ARNm PSA}) \times 1000$ . Se consideró positivo un s-PCA3 superior o igual a 35, interpretándose como una probabilidad elevada de detectar adenocarcinoma de próstata en una biopsia posterior. Se indicó biopsia únicamente en los casos con s-PCA3 positivo.

## PROTOCOLO DE BIOPSIA PROSTÁTICA

Las biopsias prostáticas fueron realizadas en quirófano bajo anestesia con sedación, ecoguiadas y por vía transrectal, obteniendo un mínimo de cinco cilindros por lóbulo, con muestras adicionales en el caso de encontrar nódulos sospechosos en el tacto rectal o en la ecografía. En aquellos pacientes en los que ya se habían realizado biopsias prostáticas previamente, las siguientes biopsias fueron realizadas por saturación, obteniendo un mínimo de 10 cilindros por lóbulo.

## ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

Dos patólogos realizaron el estudio histopatológico de manera independiente sobre secciones seriadas (5 micras) de tejido incluido en parafina y teñidas con hematoxilina-eosina complementada con estudio inmunohistoquímico con racemasa (AMACR) y marcadores de células basales (p63 y citoqueratina 34 $\beta$ E12) cuando fue preciso. Las entidades diagnósticas contempladas fueron: adenocarcinoma de próstata, proliferación microacinar atípica (ASAP), neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (H-PIN), prostatitis crónica, otros procesos no neoplásicos o normalidad. En los casos de adenocarcinoma de próstata se determinó el grado siguiendo los patrones de Gleason y se registró el número y porcentaje de cilindros afectados. La categoría ASAP se reservó para proliferaciones microglandulares con criterios morfológicos e inmunohistoquímicos de adenocarcinoma de próstata (pérdida de estrato basal y/o expresión de AMACR) pero insuficientemente representadas en las biopsias para sustentar un diagnóstico de certeza.

## ANALISIS ESTADISTICO

Se analizaron las posibles asociaciones entre parejas de variables categóricas aplicando el test exacto de Fisher mientras que para las variables continuas se utilizó el modelo de regresión lineal simple. Finalmente, para determinar la asociación entre ternas de variables categóricas se estableció el mejor modelo Log-lineal posible mediante el algoritmo stepwise y el criterio de información de Akaike (AIC). El algoritmo partía del modelo completo, es decir, con todas las

interacciones posibles entre las tres variables. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el paquete R v.2.15.1 (©2012, RDevelopmentCoreTeam).

## **RESULTADOS**

En el estudio se incluyeron 670 muestras de orina de 598 pacientes con una edad media de 65,7 años (desviación estándar de 8,0). En la gran mayoría de los casos (90,6%) se indicó el test de PCA3 por PSA elevado y biopsia previa negativa o por alteración de PSA no superior a 10 ng/ml. La media del valor del s-PCA3 fue de 47,3. El s-PCA3 no mostró una relación estadísticamente significativa con la edad, la tasa de PSA sérico, la presencia de prostatitis ni el volumen prostático. Del total de muestras analizadas, 365 tuvieron un s-PCA3 negativo, correspondientes a 328 pacientes. En estos casos, que suponen un 54,5% de las muestras y un 54,0% de los pacientes, no se indicó biopsia. Asimismo, 293 muestras (43,7%) presentaron un s-PCA3 positivo y, en estos casos, se recomendó la realización de una biopsia posterior. De las 124 biopsias estudiadas, 56 (45,2%) fueron diagnosticadas de adenocarcinoma de próstata, 11 (8,8%) de ASAP, 10 (8,0%) de H-PIN y 47 (38,0%) de benignidad o normalidad. Al situar el punto de corte del s-PCA3 en 100 o superior, el porcentaje de adenocarcinoma de próstata aumentó hasta el 57,2%, mientras que los porcentajes de ASAP y H-PIN no variaron significativamente (11,4% y 8,6% respectivamente) y el porcentaje de biopsias sin evidencia de malignidad disminuyó hasta el 22,8%. La probabilidad de biopsia positiva aumenta con el s-PCA3 ( $p=0,040$ ). El número de cilindros afectados en la biopsia pudo evaluarse en 51 casos, los cinco restantes eran muestras de resección quirúrgica. Comparando el porcentaje de cilindros afectados en la biopsia (inferior al 33% vs igual o superior al 33%) con el s-PCA3 se demuestra que al aumentar el s-PCA3 aumenta el porcentaje de cilindros afectados y su relación es estadísticamente significativa ( $p=0,023$ ). Ningún paciente con adenocarcinoma de próstata y s-PCA3 entre 35 y 50 presentó más del 33% de los cilindros estudiados afectados. El s-PCA3 y el grado de Gleason también mostraron tener una relación estadísticamente significativa ( $p=0,002$ ). Sólo el 23,0% de los pacientes con adenocarcinoma de próstata y s-PCA3 entre 35 y 50 fueron de alto grado

(Gleason $\geq$  7). Sin embargo, el 76.7% de los pacientes con AP y s-PCA3 superior o igual a 50 presentaron un Gleason $\geq$  7.

La selección del mejor modelo Log-lineal incluyendo las variables s-PCA3, grado de Gleason y porcentaje de cilindros afectados en la biopsia, conservó en la ecuación final la interacción entre el s-PCA3 y el grado de Gleason ( $p=0,00006$ ), confirmando la relación detectada con el test exacto de Fisher. El modelo obtenido también mantuvo interacción del s-PCA3 y el porcentaje de cilindros afectados ( $p=0,004$ ).

## **DISCUSION**

En nuestra serie el s-PCA3 fue independiente del PSA, de la edad del paciente, del volumen prostático y de la presencia de prostatitis, acorde con lo publicado en estudios previos. La incorporación de la determinación del s-PCA3 en el cribado de AP redujo significativamente la indicación de biopsia (54,0%) y, en los pacientes con s-PCA3 positivo, se incrementó notablemente la positividad de la biopsia (45,2%) respecto a la obtenida al indicarla únicamente en base a las cifras de PSA. El s-PCA3 mostró una relación estadísticamente significativa con el grado de Gleason y con el porcentaje de cilindros afectados.

Estos resultados coinciden con los reportados en metanálisis y revisiones publicadas previamente. En el único estudio previo existente sobre población española, se valoraron los índices de validez diagnóstica del PCA3 en el ámbito clínico, demostrando también que su incorporación mejora el cribado y reduce el número de biopsias indicadas. Empleando un punto de corte de 100 para el s-PCA3 obtenemos, en nuestra serie, un 57,2% de biopsias con adenocarcinoma de próstata, porcentaje ligeramente superior al reportado previamente en población española. Adicionalmente comprobamos, en nuestra población, la relación entre el PCA3 y los parámetros asociados a agresividad tumoral como el grado de Gleason y el porcentaje de cilindros afectados en la biopsia. En ninguna de las biopsias de nuestra serie de pacientes con s-PCA3 entre 35 y 50 se observó afectación en más del 33% de cilindros y además, en este mismo intervalo de s-PCA3, un 77% de los adenocarcinoma de próstata detectados tenían un Gleason inferior a 7. Estas cifras se invierten en los pacientes con AP y s-PCA3 superior o igual a 50 y concuerdan

con los reportados por Van Poppel et al en un estudio europeo que enroló a más de 1000 pacientes. Estos datos indican que en los pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma de próstata pero con s-PCA3 inferior a 50 predominan notablemente los de menor grado y estadio, posibles candidatos a actitud clínica conservadora.

La reducción del 54,0% en la indicación de biopsia obtenida en nuestro estudio es un primer argumento que, junto a los datos de estudios previos, avalan la introducción del PCA3 como test complementario en el manejo de pacientes sospechosos de adenocarcinoma de próstata. Un segundo argumento lo proporciona el aumento de eficiencia de las biopsias guiadas por PCA3. Si con el PSA sérico y la exploración urológica el porcentaje de biopsias positivas es inferior al 40%, con el protocolo de indicaciones de PCA3 de nuestro estudio, empleando un punto de corte mayor o igual a 35, se eleva hasta un 45,2% y llega al 54% si incluimos los casos etiquetados de ASAP que, en nuestro laboratorio, corresponden a proliferaciones con morfología e inmunofenotipo de adenocarcinoma de próstata pero insuficientemente representadas en las biopsias para sustentar un diagnóstico concluyente. Adicionalmente, el valor predictivo de grado y estadio del s-PCA3 aporta un nuevo recurso para evaluar la posible significación clínica del adenocarcinoma de próstata antes de efectuar la biopsia y seleccionar la conducta clínica idónea. Independientemente de la importancia de consolidar estos resultados ampliando prospectivamente el volumen de casos estudiados y su seguimiento clínico, la información actualmente disponible sugiere que el s-PCA3 puede aportar nuevas vías de solución para la problemática que está generando el cribado del cáncer de próstata con los recursos clínicos y bioquímicos clásicos, de especificidad y eficiencia subóptimas.

El empleo del PSA sérico como elemento de cribado del adenocarcinoma de próstata nos ha permitido profundizar en el conocimiento de su comportamiento biológico pero también ha demostrado nuestras limitaciones para predecirlo que, para reducir la mortalidad conllevan, en una proporción relevante de casos, diagnósticos y tratamientos de dudosa eficiencia. La incorporación del test de PCA3 y de otros biomarcadores en estudio, junto a la optimización tecnológica de

las técnicas radiológicas y quirúrgicas debería proporcionarnos, a corto plazo, nuevos criterios para seleccionar la conducta clínica idónea en los pacientes con sospecha de AP y la mejor opción terapéutica en los ya diagnosticados por biopsia.

**PALABRAS CLAVE:** PCA3, PSA, Cribado, Cáncer de Próstata, Grado de Gleason, Agresividad tumoral.

## **2 RESUMEN EN INGLÉS**



## INTRODUCTION

The increased use of serum Prostate Specific Antigen (PSA) analysis for early detection of prostate adenocarcinoma has resulted in a significant rise in the number of prostate biopsies. Due to PSA's low specificity, a significant number of biopsies are performed in patients with benign conditions. A group of patients with altered PSA values below 10 ng/mL, known as diagnosis "gray area", is made up by patients with benign prostatic hyperplasia, prostatitis and prostate adenocarcinoma. In the first two cases, biopsies are negative (about 75% according to published data) and repeated if PSA levels remain unchanged. In the third case, patients are diagnosed with prostate adenocarcinoma but, in several instances, carcinomas are of doubtful clinical significance and in elderly patients. In this context, radical surgical treatment does not necessarily extend patients' life expectancy. Some reviews of autopsies series found hidden prostate adenocarcinoma in 40% of patients aged over 60 and in 60% of patients over 80. Patients with this type of neoplasia were asymptomatic and uncompromised, but an increase in serum PSA could activate clinical biopsy protocols and result in surgical treatment. Issues concerning prostate adenocarcinoma screening with PSA are well documented and its disadvantages far outnumber and outweigh its impact on mortality. The U.S. Preventive Services Task Force recently issued a grade D recommendation against routine PSA screening to asymptomatic patients. Many articles have been written and debate has been stirred as a result of this recommendation, which proves the need to rethink existing prostate adenocarcinoma screening, diagnosis and treatment protocols and strengthen the search for new specific and predictive prostate adenocarcinoma biomarkers.

PCA3 gene, widely studied in recent years, is probably one of the first clinically applied biomarkers. This gene, located on chromosome 9q21-22 is transcribed exclusively in prostate tissue and significantly overexpressed in malignant prostate tissue compared with benign or adjoining normal tissue. Unlike PSA, PCA3 overexpression is prostate adenocarcinoma-specific regardless of prostate volume and the presence of hyperplasia. Since 2006, there is a diagnostic kit available for

clinical application which detects PCA3 gene mRNA levels in urine samples collected after prostate massage and provides a PCA3 score (s-PCA3).

In a meta-analysis published in 2010, PCA3 was assigned a negative predictive value of 87.8-98%, thus showing satisfactory diagnostic validity indexes for use in prostate adenocarcinoma diagnosis. In addition, the test can be easily implemented in both clinical and laboratory protocols. Early studies already revealed a directly proportional relationship between s-PCA3 and the percentage of later positive biopsies. More recent studies also identified the relationship between s-PCA3 and several determinants of tumor aggressiveness such as Gleason grade, tumor volume and extracapsular invasion. In its 2010 guidelines, The European Association of Urology included the use of complementary PSA biomarkers, expressly noting PCA3 for its greater specificity and sensitivity.

This study analyses the impact of PCA3 introduction in the clinical management of patients with altered PSA, focusing on the reduction of prostate biopsies performed and PCA3 as an alleged predictor of tumor aggressiveness in patients who are already diagnosed of prostate adenocarcinoma.

## **MATERIAL AND METHODS**

An observational, prospective, multicenter study of patients with suspected prostate adenocarcinoma, who are eligible for prostate biopsy, was designed. An inclusion/exclusion criteria protocol was established with expressed consent and upheld to an Ethics Committee.

### **SAMPLES AND PATIENTS**

670 post-prostatic massage urine samples taken from 598 consecutive urology patients between October 2009 and November 2012 were included in the study. Sixty six of these patients had more than one urine sample analyzed over the course of their treatment. To allow for comparative statistical analysis with other clinical parameters (age, PSA serum levels, prostatitis and prostate volume), only the latest PCA3 study was used. All prior studies were dismissed, which resulted in the exclusion of 72 samples. All patients met one or more of the following criteria: elevated PSA and a previous negative biopsy, altered PSA under 10 ng/mL without biopsy, altered PSA levels and a diagnosed benign prostatic condition (Prostatitis,

hyperplasia) and elevated PSA levels in patients with high comorbidity linked to greater risks during biopsy. Patients with previous prostate adenocarcinoma diagnosis were excluded.

Patients ages were recorded, as was the total value PSA (ng/ml), PSA index, coexisting prostatitis or hyperplasia and prostate volume (cc). The number of cylinders obtained and the millimeters of prostatic tissue were recorded whenever biopsies were performed. When prostate adenocarcinoma was diagnosed, the number of cylinders affected, tumor percentage (millimeters) and Gleason score were also recorded.

#### PCA3 DETERMINATION

First-void urine after prostatic massage, consisting of three probings per lobe, was collected and s-PCA3 was determined using ProgenSA™ kit PCA3Assay (Gen-Probe). By quantifying PCA3 and PSA mRNA an s-PCA3 was calculated using the formula:  $(\text{PCA3 mRNA} / \text{PSA mRNA}) \times 1000$ . PCA3 scores of 35 or higher were considered positive, and taken to indicate a high possibility of prostate adenocarcinoma identification in a subsequent biopsy. Biopsies were only prescribed to patients with PCA3 positive scores.

#### PROSTATE BIOPSY PROTOCOL

Transrectal ultrasound-guided prostate biopsies were performed in the operating room under anesthesia by sedation. A minimum of five cylinders per lobe were obtained with additional samples taken whenever suspicious nodules were found during digital rectal examination or ultrasound. Saturation biopsies were performed on patients who had already undergone prostate biopsies, obtaining a minimum of 10 cores per lobe.

#### HISTOPATHOLOGICAL STUDY

Two pathologists independently performed a histopathological study of serial sections (5 microns) of paraffin-embedded tissue stained with hematoxylin-eosin, complemented with immunohistochemical study racemase (AMACR) and basal cell markers (p63 and cytokeratin 34βE12), when appropriate. Diagnostic entities covered were: prostate adenocarcinoma, atypical small acinar proliferation

(ASAP), high grade prostatic intraepithelial neoplasia (H-PIN), chronic prostatitis or other non-neoplastic processes. In prostate adenocarcinoma cases, grade was determined following the Gleason grading system, the millimeters of tumor and the number and percentage of affected cylinders were recorded. The ASAP category was reserved for microglandular proliferations with morphological criteria and immunohistochemical profile of prostate adenocarcinoma (loss of basal layer and / or expression of AMACR) but underrepresented in biopsies to support a definitive diagnosis of prostate adenocarcinoma.

### STATISTICAL ANALISYS

Possible associations between pairs of categorical variables were analysed using Fisher's exact test whereas a simple linear regression model was used for continuous variables. Finally, to determine the association between categorical variables shortlists the best possible log-linear model was established using the stepwise algorithm and the Akaike information criterion (AIC). The algorithm was based on the full model, i.e., encompassing all possible interactions between the three variables. All statistical analyzes were performed with the R package v.2.15.1 (© 2012, RDevelopmentCoreTeam).

### RESULTS

670 urine samples from 598 patients with a mean age of 65.7 (SD 8.0) were included in the study. In most cases (90.6%) PCA3 tests were indicated due to elevated PSA and previous negative biopsy or PSA alteration no higher than 10ng/mL. s-PCA3 had an average value of 47.3. s-PCA3 showed no statistically significant relationship with age, the PSA serum rate, the presence of prostatitis or prostate volume. Of all samples analyzed, 365 had negative s-PCA3, corresponding to 328 patients. In these cases, which accounted for 54.5% of the samples and 54.0% of patients, no biopsy was indicated. 293 samples (43.7%) showed a positive s-PCA3 and, in these cases, a repeat biopsy was recommended. Of the 124 biopsies studied, 56 (45.2%) were diagnosed of prostate adenocarcinoma, 11 (8.8%) of ASAP, 10 (8.0%) of H-PIN and 47 (38.0%) were benign or normal. By setting the cutoff s-PCA3 at 100 or higher, the percentage of prostate

adenocarcinoma increased to 57.2%, while the percentage of H-PIN and ASAP showed no significant change (11.4% and 8.6% respectively) and the percentage of biopsies with no evidence of malignancy decreased to 22.8%. The probability of positive biopsy increases with s-PCA3 ( $p = 0.040$ ). The number of cylinders involved in the biopsy could be assessed in 51 cases, the remaining five samples were surgical resections. Comparing the percentage of biopsy cores affected (more than 33% vs less than 33%) with s-PCA3 demonstrated that increasing s-PCA3 increases the percentage of affected cylinders and their relationship is statistically significant ( $p = 0.023$ ). No patients with prostate adenocarcinoma and s-PCA3 between 35 and 50 showed more than 33% of cylinders affected. s-PCA3 and Gleason scores were also shown to have a statistically significant relationship ( $p = 0.002$ ). Only 23.0% of patients with prostate adenocarcinoma and s-PCA3 between 35 and 50 were high grade (Gleason  $\geq 7$ ). Moreover, 76.7% of patients with prostate adenocarcinoma and s-PCA3 exceeding 50 had Gleason  $\geq 7$ .

By selecting the best Log-linear model including the variables s-PCA3, Gleason score and percentage of biopsy cores affected, the interaction between s-PCA3 and Gleason score ( $p = 0.00006$ ) was maintained in the final equation, thus confirming the relationship detected with Fisher's exact test. The model obtained also maintained s-PCA3 interaction with the percentage of affected cylinders ( $p=0.004$ ).

## **DISCUSSION**

In our series, s-PCA3 was independent of PSA, patient age, prostate volume and presence of prostatitis, which is consistent with previously published studies. Introducing s-PCA3 determination in prostate adenocarcinoma screening significantly reduced biopsy indication (54.0%). In patients with positive s-PCA3 there was a significant increase of positive biopsies (45.2%) compared to positives obtained when indicating biopsies only on the basis of PSA levels. s-PCA3 showed a statistically significant relationship with Gleason scores and the percentage of affected cylinders.

These results support those reported in meta-analysis and previously published reviews. In the only existing study on Spanish population, rates of s-PCA3 diagnostic accuracy in a clinical setting were evaluated, demonstrating that its

introduction also improved screening and reduced the number of indicated biopsies. Using a s-PCA3 cutoff of 100 in our series, we found 57.2% of biopsies with prostate adenocarcinoma, a slightly higher percentage than previously reported in Spanish population. Additionally, the relationship between PCA3 and the parameters linked to tumor aggressiveness, such as Gleason score and percentage of biopsy cores affected, was checked in our population. None of the biopsies of patients with s-PCA3 between 35 and 50 in our series presented affectation over 33% of cylinders. Within the same s-PCA3 range, 77% of detected prostate adenocarcinomas had a Gleason under 7. These figures are reversed in patients with prostate adenocarcinoma and s-PCA3 exceeding 50 and are consistent with those reported by Van Poppel et al. in a European study of over 1000 patients. This data indicates that the majority of patients diagnosed with prostate adenocarcinoma with s-PCA3 under 50 have prostate adenocarcinoma of lower grades and stages, and therefore become potential candidates for a more conservative clinical approach.

The 54.0% reduction in biopsy indication obtained in our study is the first argument to support the introduction of PCA3 as a complementary test in the management of patients with suspected prostate adenocarcinoma. The increased efficiency of PCA3-guided biopsies provides a second argument. While the percentage of positive biopsies indicated by PSA and urological examination is less than 40%, with the PCA3 indication protocol of our study, using a cut-off value of 35, this percentage rises to 45.2% and it reaches 54% if ASAP cases are included. In our laboratory, ASAP cases correspond to prostate adenocarcinoma morphology and immunophenotype but are underrepresented in biopsies to support a conclusive diagnosis. Additionally, the predictive value of grade and stage of s-PCA3 brings a new resource to assess the potential clinical significance of prostate adenocarcinoma before the biopsy and allows the selection of the appropriate clinical management. These results must be consolidated prospectively expanding the volume of case studies and clinical follow-up. However, currently available information suggests that s-PCA3 can provide new ways of addressing issues surrounding prostate cancer screening using classic clinical and biochemical resources, whose specificity and efficiency are suboptimal.

The use of PSA as a prostate adenocarcinoma screening tool has deepened our knowledge of prostate adenocarcinoma's biological behavior but it has also shown our limitations to predict it. In order to reduce mortality, PSA leads to diagnosis and treatment of doubtful efficiency in a significant proportion of cases. The introduction of PCA3 tests and other biomarkers under study, together with technological optimization of radiological and surgical techniques, should provide, in the not too distant future, new criteria for selecting the optimal clinical approach for patients with suspected prostate adenocarcinoma and the best treatment options for patients already diagnosed by biopsy.

**KEY WORDS:** PCA3, PSA, Screening, Prostate Cancer, Gleason, Tumor aggressiveness.



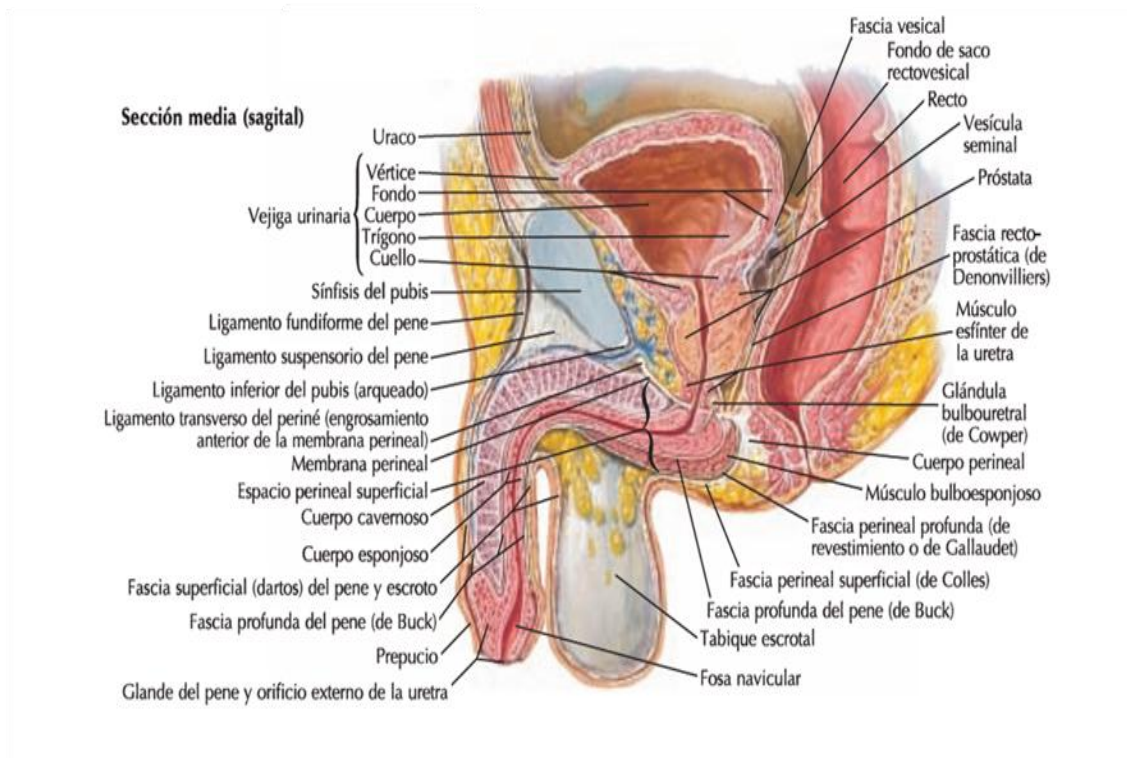
## **3 INTRODUCCIÓN**



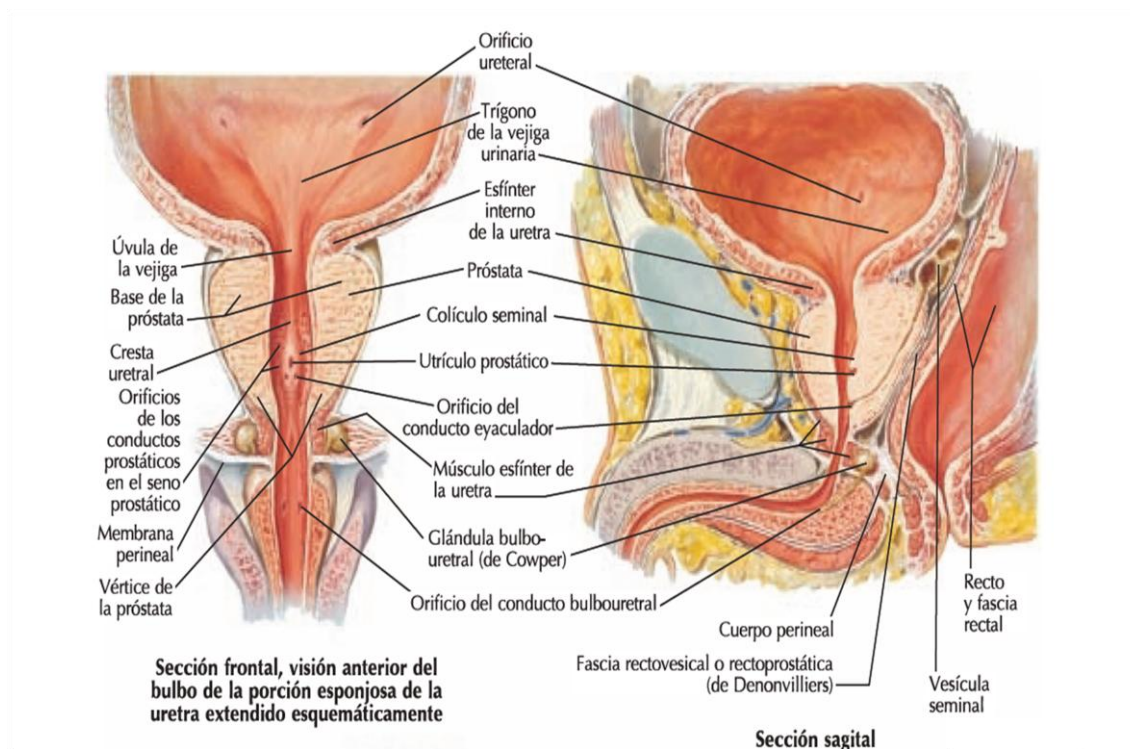
## 3.1 LA PRÓSTATA

### 3.1.1 ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y FUNCIÓN

La próstata es un órgano retroperitoneal localizado debajo de la vejiga urinaria y delante del recto (Figura 1). Rodea el cuello vesical y parte de la uretra (Figura 2), se halla desprovista de una cápsula delimitada y en el adulto normal pesa aproximadamente 20 gramos y mide 3 cm de largo.



**Figura 1: Localización anatómica de la próstata. (Modificado de(Netter 2011)).**

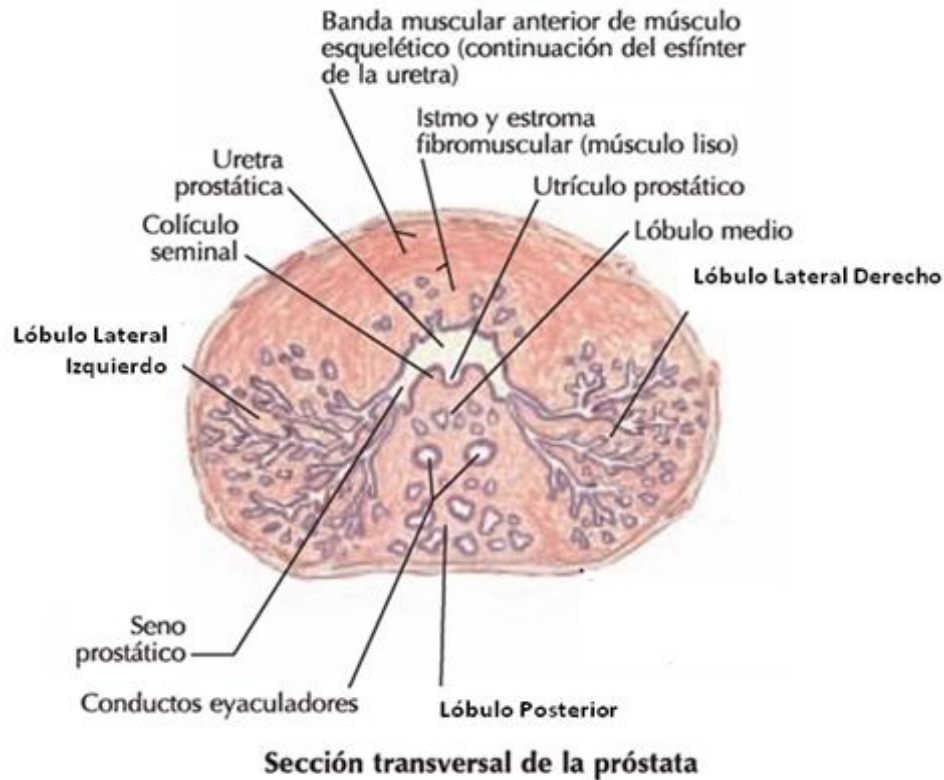


**Figura 2: Localización anatómica de la próstata. Detalle de la sección frontal (izquierda) y sagital (derecha). (Modificado de (Netter 2011)).**

La función principal de la próstata es producir y almacenar un fluido alcalino rico en proteínas que proporciona nutrientes al líquido seminal. Aproximadamente el 25% del volumen seminal está constituido por líquido prostático junto con espermatozoides y fluido de la vesícula seminal. El pH alcalino del semen neutraliza la acidez de la vagina prolongando la vida de los espermatozoides, mejorando su motilidad y protegiendo su ADN.

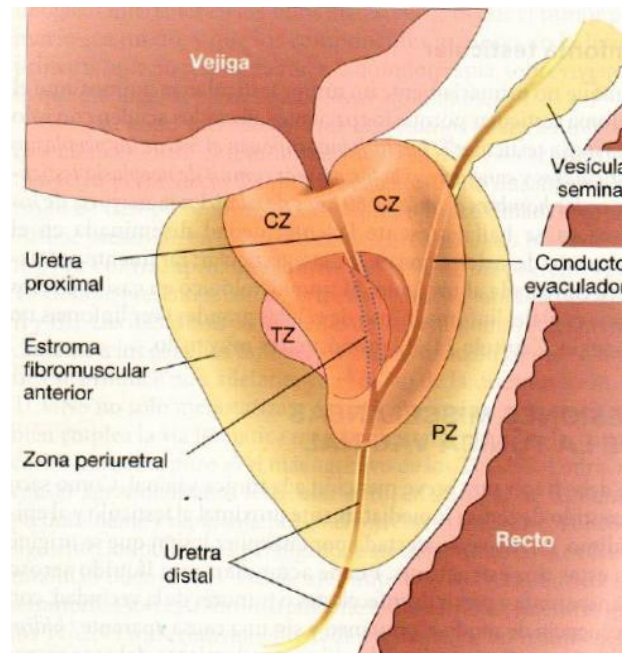
En anatomía se divide la próstata en diferentes lóbulos: el anterior, o porción anterior de la glándula situada delante de la uretra, el lóbulo medio situado entre los dos conductos eyaculadores, los dos lóbulos laterales (derecho e izquierdo) separados por la uretra prostática, que constituyen la mayor parte de la glándula, y

finalmente el lóbulo posterior que corresponde a la parte posteromedial de los lóbulos laterales. Esta zona puede ser palpada mediante un tacto rectal (Figura 3).



**Figura 3: Sección transversal de la próstata que muestra los lóbulos en los que se divide. (Modificado de (Netter 2011)).**

La clasificación por zonas se usa en patología y fue propuesta por McNeal en 1968 (McNeal 1981). Según ésta, el parénquima prostático puede dividirse en cuatro zonas: la zona periférica y la central que componen el 95% de la glándula normal, la zona periuretral de transición y la zona fibromuscular anterior (Figura 4).

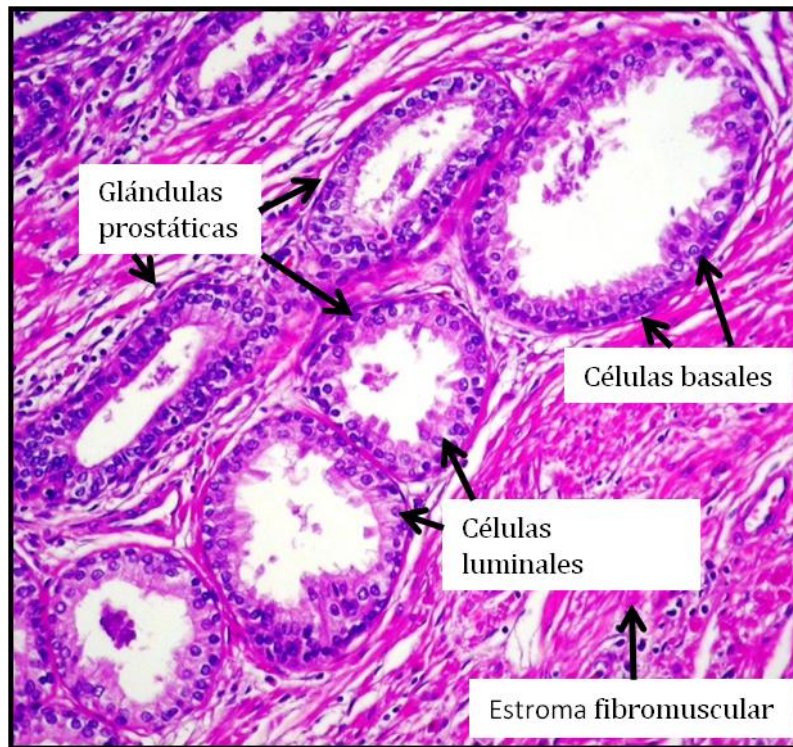


**Figura 4. Próstata adulta normal. Clasificación por zonas: zona central (CZ), zona periférica (PZ), zona de transición (TZ) y zona periuretral. (Modificado de (Vinay Kumar 2005)).**

La zona periférica constituye la mayor parte del tejido prostático apical, lateral y posterior representando un 70% del tejido glandular. En esta zona se originan el 70% de los carcinomas de próstata (CaP). La zona de transición representa entre el 5 y el 20% del tejido prostático. Cuando las células de esta región proliferan, se origina la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB); en la zona de transición también aparecen el 20% de los CaP. La zona central rodea los conductos eyaculadores; sólo un 2,5% de los CaP reportados se originan en esta zona, pero suele tratarse de tumores agresivos que invaden las vesículas seminales.

Histológicamente, la próstata es un órgano túbulo-alveolar compuesto por espacios glandulares revestidos por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado. Las glándulas se hallan característicamente revestidas por dos capas de células: una

capa basal de epitelio cúbico bajo cubierto por una capa de células mucosecretoras cilíndricas. Las glándulas tienen una membrana basal nítida y se hallan separadas entre sí por un abundante estroma fibromuscular (Figura 5).



**Figura 5: Sección microscópica de parénquima prostático (Hematoxilina-Eosina. 400x).**

Existen 5 tipos celulares diferentes que configuran las glándulas prostáticas:

1. El tipo epitelial predominante corresponde a células secretoras lumbinales que se disponen como una capa continua de células columnares polarizadas. Son células dependientes de andrógenos que secretan proteínas y expresan marcadores como la citokeratina 8, el marcador de superficie celular CD57 y el Receptor de Andrógenos (AR)(Abate-Shen and

- Shen 2000). También secretan Antígeno Prostático Específico (PSA) y Fosfatasa Acida Prostática (PAP).
2. Las células basales son el segundo tipo de célula epitelial predominante. Forman una monocapa por debajo del epitelio columnar que rodea cada glándula. Son células relativamente poco diferenciadas que expresan p63 y las citokeratinas de alto peso molecular 5 y 14, así como CK903. No tienen actividad secretora y expresan niveles bajos de AR (Abate-Shen and Shen 2000).
  3. Las células neuroendocrinas. son un porcentaje discreto de las células que componen el epitelio prostático normal pero secretan péptidos neuroendocrinos esenciales para el crecimiento y diferenciación de las células que las rodean. Expresan marcadores neuroendocrinos como la cromogranina A y la serotonina, y no expresan AR (Abate-Shen and Shen 2000).
  4. Las células intermedias. expresan marcadores tanto de células basales como de células secretoras y/o neuroendocrinas. Expresan las citokeratinas 5 y 8/18 y son negativas para p63. Se ha postulado que se trata de células proliferativas progenitoras que se hallan en un proceso de transición hacia la diferenciación en un fenotipo secretor (Tran, et al. 2002).
  5. Las Células madre. se encuentran en la capa basal de la glándula y fueron descritas como las responsables de la regeneración de la próstata en experimentos cíclicos de privación de andrógenos (Aboushwareb and Atala 2008).

En la próstata también se encuentran diferentes tipos de células estromales como fibroblastos, miofibroblastos y células de músculo liso que guían el crecimiento y diferenciación del epitelio.

### **3.1.2 PATOLOGÍA DE LA PROSTATA**

Los principales procesos patológicos que afectan la glándula prostática son la prostatitis, la hiperplasia prostática benigna y las neoplasias.

#### **3.1.2.1 PROSTATITIS**

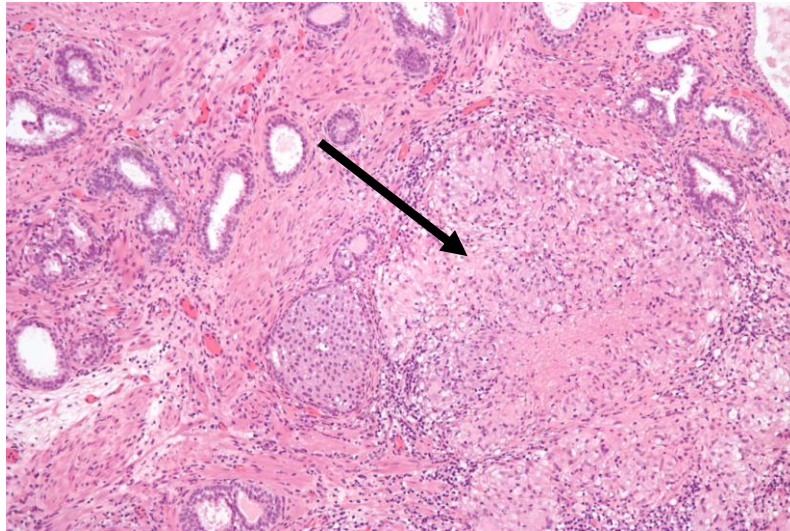
La inflamación de la próstata se conoce como prostatitis y se divide en tres categorías: *prostatitis bacteriana aguda/crónica*, *prostatitis abacteriana crónica* y *prostatitis granulomatosa* (Lipsky 1999).

La *prostatitis bacteriana aguda* es el resultado de bacterias que causan infección en el tracto urinario. La mayoría están causadas por cepas de *Escherichia coli*, otros bacilos gramnegativos, enterococos y estafilococos. El diagnóstico se establece por cultivo de orina y por las características clínicas.

La *prostatitis bacteriana crónica* es difícil de diagnosticar y tratar. Se manifiesta con dolor lumbar, disuria y molestias perineales y suprapúbicas aunque puede ser virtualmente asintomática. Un cuadro clínico común son las infecciones urinarias recurrentes (cistitis, uretritis) causadas por la misma especie de microorganismo. Los microorganismos implicados son los mismos que los citados como causa de prostatitis aguda.

La *prostatitis abacteriana crónica* es la forma más común de prostatitis observada en la actualidad. Es clínicamente indistinguible de la prostatitis bacteriana crónica. Sin embargo, no hay historia de infección recurrente del tracto urinario y los cultivos bacterianos son uniformemente negativos. Su etiología no está bien definida aunque se ha sugerido un posible mecanismo químico por reflujo de orina hacia los acinos prostáticos.

Finalmente, la *prostatitis granulomatosa* puede ser específica cuando puede identificarse un agente infeccioso causal (Wise and Silver 1993). Actualmente la causa más común se relaciona con la instilación en la vejiga del bacilo de Calmette-Guérin (BCG) para el tratamiento del cáncer vesical superficial. El BCG es una cepa atenuada de *Mycobacterium tuberculosis* que da lugar a un cuadro histológico en la próstata indistinguible del que se observa en la tuberculosis sistémica (Figura 6). Sin embargo, en este contexto, el hallazgo de granulomas en la próstata no tiene significado clínico y no requiere tratamiento.



**Figura 6: Imagen microscópica de prostatitis granulomatosa (Hematoxilia-eosina 100X): en el estroma glandular se observa un granuloma con células histiocitarias epitelioides y centro necrótico, idéntico a los que pueden observarse en casos de tuberculosis.**

Por otro lado, la *prostatitis granulomatosa fúngica* se observa sólo en contextos clínicos de inmunodeficiencia, mientras que la *prostatitis granulomatosa inespecífica* es relativamente común y representa una reacción a secreciones procedentes de conductos y acinos prostáticos rotos.

En pacientes con síntomas de prostatitis aguda o crónica, raramente se obtienen biopsias o piezas quirúrgicas ya que la enfermedad se trata farmacológicamente. Las características microscópicas de la prostatitis pueden estudiarse habitualmente en las muestras prostáticas extirpadas quirúrgicamente por otras causas. Microscópicamente la prostatitis aguda suele aparecer como infiltrado inflamatorio de polimorfonucleares neutrófilos en el estroma, microabcesos glandulares y áreas necróticas.

En la prostatitis crónica, bacteriana y abacteriana, la reacción inflamatoria consta predominantemente de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos.

### **3.1.2.2 HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA**

El aumento nodular benigno en la próstata se conoce como Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) o hiperplasia nodular, es un trastorno muy frecuente en los hombres de más de 50 años (Ramsey 2000) y no se considera una lesión premaligna. Se caracteriza por hiperplasia del estroma prostático y de las células epiteliales, lo que da lugar a la formación de nódulos grandes y definidos en la región periuretral de la próstata. Cuando son suficientemente grandes, los nódulos comprimen y estenosan el conducto uretral y causan una obstrucción que puede ser parcial o completa. Los síntomas clínicos de esta situación son retención de orina y disfunción vesical.

La HPB se da en aproximadamente el 20% de los hombres de 40 años, cifra que aumenta al 70% a los 60 años y al 90% a los 70 años. No existe una relación directa entre los cambios histológicos y los síntomas clínicos. Sólo el 50% de los pacientes que presentan criterios microscópicos de HPB presentan a la vez un agrandamiento clínicamente detectable de la próstata y, de éstos, sólo el 50% llega a manifestar síntomas clínicos. No obstante la HPB es un problema clínico de gran importancia. Aproximadamente el 30% de los hombres de ascendencia europea y de más de 50 años de edad presentan síntomas de moderados a intensos.

La etiología de la HPB se relaciona con la acción de los andrógenos. La próstata metaboliza la testosterona circulante en DiHidroTestosterona (DHT), responsable

en última instancia del crecimiento prostático, por la acción de la enzima  $\alpha$ -reductasa de tipo 2 localizada en las células del estroma. Una vez sintetizada, la DHT puede actuar de modo autocrino sobre las células de su entorno o de modo paracrino, difundiéndose a las células epiteliales próximas. En ambos casos, la DHT se fija a los receptores nucleares de andrógenos e induce la transcripción de factores de crecimiento para células epiteliales y estromales. Aunque la testosterona puede fijarse también a los receptores de andrógenos y causar la estimulación del crecimiento celular, la DHT es diez veces más potente porque se disocia del receptor más lentamente. La importancia de la DHT en la etiología de la HPB se ve apoyada por las observaciones clínicas en las que se administra un inhibidor de la  $5\alpha$ -reductasa a pacientes con esta afección observándose en la mayoría de los casos una disminución del volumen prostático y de la obstrucción urinaria (McConnell, et al. 2003).

Además de los efectos mecánicos del aumento de volumen de la próstata, los síntomas clínicos de obstrucción del tracto urinario inferior se deben también a la contracción prostática mediada por el músculo liso cuya tensión media el  $\alpha_1$ -adrenorreceptor del estroma prostático. Así, es común el empleo de antagonistas del receptor  $\alpha$ -adrenérgico para reducir la obstrucción en pacientes con HPB.

La HPB se origina casi exclusivamente en la zona de transición contigua a la uretra y, por tanto, la comprime fácilmente obliterando la luz en mayor o menor grado. Los pacientes con HPB muestran niveles de PSA sérico elevados.

### **3.1.2.3 LESIONES PREMALIGNAS**

#### **NEOPLASIA INTRAEPITELIAL PROSTÁTICA**

La Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN) se define histológicamente por la presencia de características nucleares y citoplasmáticas similares a las presentes en CaP pero de localización intraluminal en glándulas de configuración preservada (Haggman, et al. 1997). Las alteraciones se concentran en el epitelio y, a diferencia de lo que ocurre en el CaP, la lámina basal permanece intacta (Montironi, et al. 2007). Los cambios citológicos característicos de la PIN incluyen la presencia de nucléolos prominentes en al menos el 5% de las células, aumento del tamaño del núcleo, hipercromatismo y aumento de la densidad del citoplasma. Estos cambios microscópicos se acompañan de sobreexpresión de marcadores de proliferación celular (Bostwick, et al. 1998).

La PIN se divide en dos categorías (Montironi, et al. 2006):

- PIN de bajo grado (LGPIN): Supone alteraciones núcleo-citoplasmáticas leves en el epitelio glandular. Las células presentan nucléolos de tamaños distintos y cromatina normal o ligeramente aumentada. La tinción mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-racemasa (AMACR) suele ser negativa. A este tipo de lesión (LGPIN) no se le concede actualmente significación clínica y se aconseja no incluirla en el informe histopatológico aunque esté presente, a diferencia de las lesiones con mayor grado de atipia (HGPIN), que deben reportarse siempre.

- PIN de alto grado (HGPIIN): presenta nucléolos grandes de tamaño uniforme, muy parecidos a los observados en CaP y un aumento en el contenido de cromatina. La tinción con AMACR puede ser positiva en el citoplasma.

La HGPIIN se considera una lesión precursora de CaP según diversos estudios que ponen en evidencia los siguientes argumentos:

1. La incidencia y extensión de la HGPIIN aumenta con la edad (Montironi, et al. 2000).
2. La HGPIIN se localiza en la zona periférica al igual que la mayoría de los CaP.
3. La frecuencia, extensión y severidad de la HGPIIN aumenta cuando coexiste con el CaP.
4. La aparición de HGPIIN se correlaciona con la de CaP diez años después.
5. Los índices de proliferación y muerte celular son altos en HGPIIN y CaP en comparación con el tejido prostático normal.
6. Las HGPIIN son lesiones multifocales según estudios de alteraciones cromosómicas y desequilibrio alélico.

### **PROLIFERACION MICROACINAR ATÍPICA**

La proliferación microacinar atípica, traducción del término anglosajón *Atypical Small Acinar Proliferation* (ASAP), se utiliza para categorizar, en el estudio anatomopatológico de biopsias de próstata, el hallazgo de grupos de microglándulas con rasgos estructurales y citológicos sugestivos de malignidad pero no concluyentes, que no permiten un diagnóstico de certeza de

adenocarcinoma pero obligan a repetir las biopsias o a un seguimiento estricto del paciente (Montironi, et al. 2006; Van der Kwast, et al. 2010).

La causa de la incerteza del patólogo puede ser de carácter cualitativo (criterios sugestivos de malignidad pero no concluyentes) o cuantitativo (lesión altamente sugestiva de malignidad pero insuficientemente representada en las muestras). En cualquier caso, el término ASAP no define una entidad distinta o intermedia entre benignidad y malignidad sino que representa un recurso terminológico para expresar una situación de duda en el examen morfológico y transmitirla al urólogo para que, junto al contexto clínico y bioquímico, seleccione la mejor opción para el manejo del paciente. Los focos de ASAP suelen ser inferiores a 1 mm y la incidencia reportada en biopsias prostáticas es del 2-3%, aunque es muy variable entre distintos laboratorios.

Aunque no se trata de una entidad clínico-patológica establecida, la mayoría de los autores considera la ASAP como una categoría diagnóstica de riesgo. Diversos estudios han demostrado que el diagnóstico de ASAP es predictivo de malignidad ya que en el 34-60% de los casos se confirma el diagnóstico de adenocarcinoma en una biopsia prostática posterior (Ryu, et al. 2010).

## **3.2 CÁNCER DE PRÓSTATA**

La inmensa mayoría de las neoplasias malignas prostáticas se originan en el epitelio glandular acinar (adenocarcinoma acinar). Menos frecuente es el origen el epitelio ductal (adenocarcinoma ductal). Las neoplasias malignas de estirpe mesenquimal (sarcomas) son muy infrecuentes (0,1-0,2%). En el presente trabajo se utiliza la abreviación CaP referida siempre al adenocarcinoma de próstata cuyas características histopatológicas se exponen con detalle en el apartado 3.2.5.

Aunque la mayoría de los CaP que actualmente se diagnostican son de crecimiento lento y poco agresivos, existe una proporción no despreciable de adenocarcinomas de alta agresividad que cuando son sintomáticos suelen hallarse en estadio localmente avanzado o incluso con metástasis en ganglios linfáticos, óseas o en otras localizaciones.

### **3.2.1 SINTOMATOLOGÍA**

La gran mayoría de CaPs se diagnostican en la actualidad por cribado de población asintomática a partir de la detección de antígeno prostático específico (PSA) elevado en suero y biopsia posterior en los casos en que el urólogo lo considera indicado. En los casos sintomáticos, que suponen aproximadamente 1 de cada 3 pacientes, el tumor puede ocasionar sintomatología local por efecto masa, muy similar a la de la HPB pero generalmente progresa de forma asintomática hasta estadios avanzados.

La sintomatología local puede incluir polaquiuria, nicturia, disuria y raramente hematuria u otros trastornos en la micción, en la erección o en la eyaculación (Miller, et al. 2003).

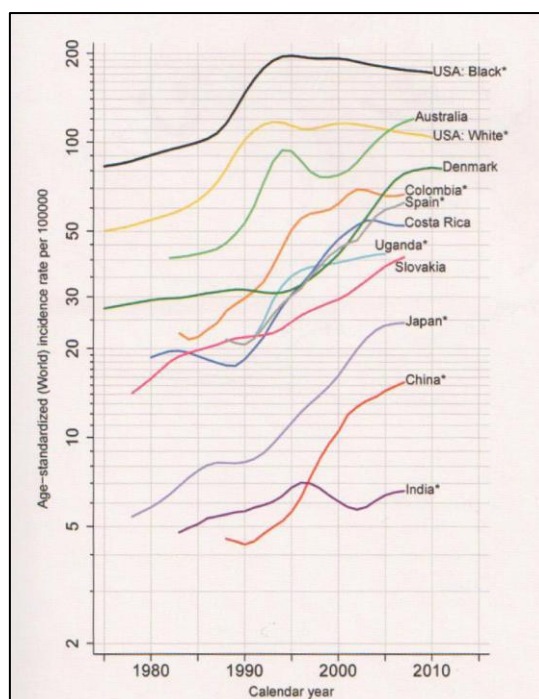
En los casos avanzados los síntomas dependerán de la extensión a órganos vecinos o de las metástasis, entre los cuales, el más común es el dolor secundario a las metástasis óseas (costillas, pelvis, columna vertebral). Las metástasis vertebrales pueden condicionar compresión medular y sintomatología neurológica periférica secundaria.

### **3.2.2 EPIDEMIOLOGÍA**

A nivel mundial, el CaP es el segundo tipo de cáncer más prevalente y la quinta causa más común de muerte por cáncer en hombres, con 1,1 millones de nuevos casos (15% de todos los cánceres en hombres) y 300.000 muertes (7% de todas las muertes por cáncer en hombres) sólo en el año 2012 (WHO 2014).

El 60% de estos nuevos casos y el 41% de las muertes tuvieron lugar en Norteamérica y Europa. En Estados Unidos, el CaP presenta la incidencia más alta entre todos los cánceres no cutáneos y es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres (American Cancer Society, 2011), con un número estimado de 28.000 muertes en el año 2012 (Siegel, et al. 2012). En Europa, en el año 2008 se diagnosticaron 382.300 nuevos casos de CaP y 89.300 pacientes fallecieron a causa de este tumor (Ferlay, et al. 2010). La mortalidad es más alta entre poblaciones de origen africano, pero también en poblaciones nórdicas.

La incidencia de CaP presenta una enorme variación en diferentes partes del mundo. Las tasas más altas se encuentran en Australia y Nueva Zelanda (111,6 por 100.000) seguidas por Europa y Norteamérica (Figura 7). Dichas tasas aumentaron drásticamente a finales de los años 80 en Norteamérica, debido a la introducción y uso masivo de la determinación del PSA en suero. Un patrón similar de crecimiento en las tasas de incidencia de CaP fue observado en otros países desarrollados durante los años 90, y actualmente también se está observando en países emergentes (WHO 2014).

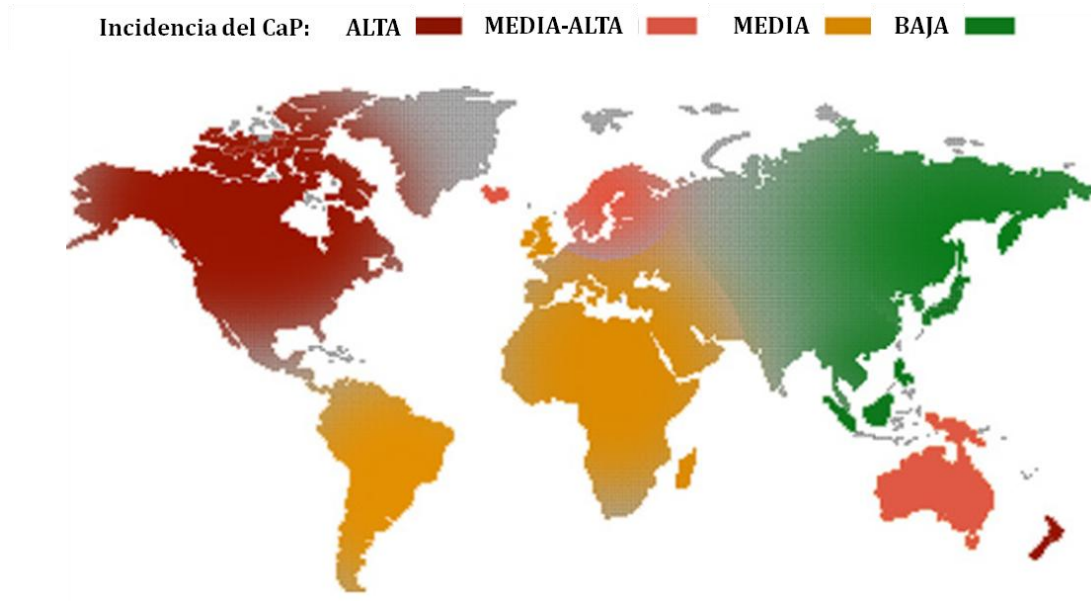


**Figura 7: Tasas de incidencia de CaP estandarizadas por edad entre 1975 y 2012 (por cada 100.000 habitantes) en diferentes partes del mundo. (WHO 2014).**

### 3.2.3 FACTORES DE RIESGO

Un buen conocimiento de los factores de riesgo de la carcinogénesis prostática permite la detección temprana de la enfermedad y el desarrollo de terapias dirigidas. Actualmente los factores de riesgo de CaP que se consideran de mayor importancia son la edad, los antecedentes familiares y el grupo étnico. Como en la gran mayoría de las neoplasias malignas, el riesgo de CaP puede estar en relación con factores genéticos y epigenéticos y con factores ambientales o adquiridos como enfermedades inflamatorias e infecciosas, los niveles de andrógenos, la dieta y el estilo de vida. A continuación, se revisan con mayor detalle los factores de riesgo anteriormente mencionados:

**Edad:** La edad constituye uno de los factores de riesgo más importantes de CaP (Patel and Klein 2009). Antes de los 45 años se diagnostican menos del 0,6% de los casos y a partir de los 65 años el 62-85% (Fournier, et al. 2004). En Estados Unidos, el riesgo relativo (RR) de desarrollar CaP antes de los 39 años es de 0,01 (un caso por cada 10.002 hombres). Entre los 40 y 59 años, el RR es de 2,43 (un caso por cada 41 hombres) y para los hombres de entre 60 y 69 años es de 6,42 (un caso por cada 16 hombres). Finalmente, en hombres mayores de 70 años, el RR es de 12,49 (un caso por cada 8 hombres)(Ferris-i-Tortajada, et al. 2011). En la población estadounidense de ascendencia europea, existe un riesgo 130 veces mayor entre los 75 y 79 años que entre los 45 y 49 años. Como veremos más adelante, esta gran diferencia, además del factor edad, también refleja el incremento asociado al uso masivo de la determinación del PSA.



**Figura 8: Incidencia del cáncer de próstata a nivel global. (Modificado de [www.prostatecancerprevention.net](http://www.prostatecancerprevention.net)).**

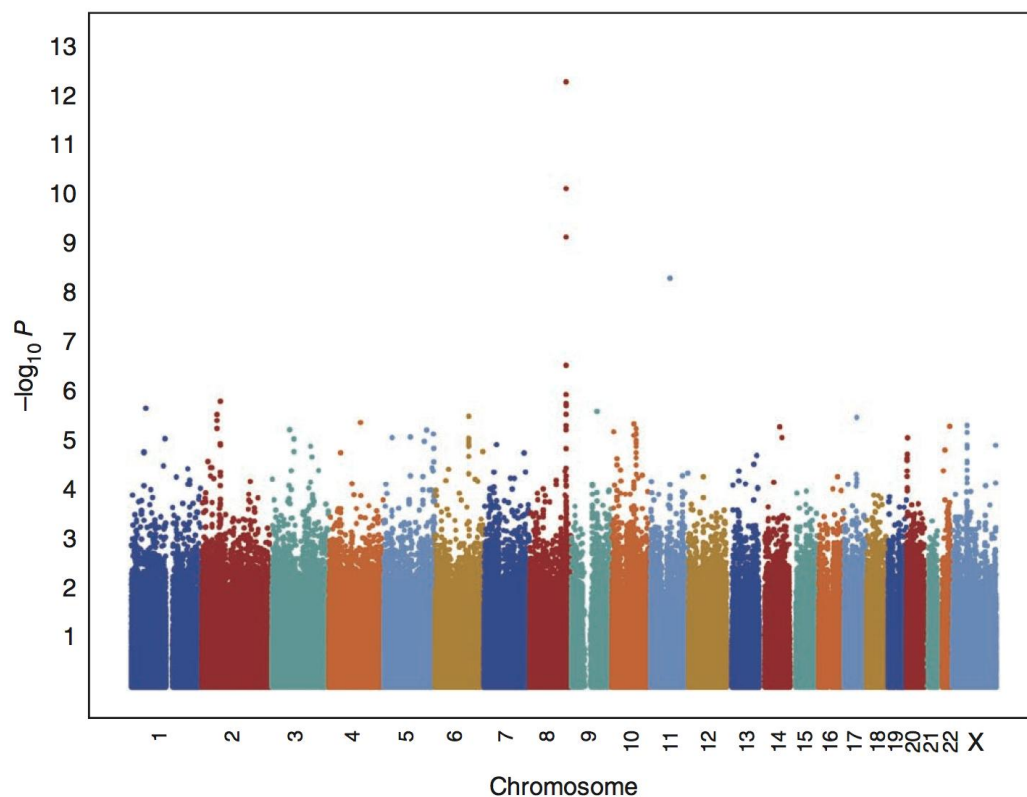
**Grupo étnico:** La incidencia de CaP varía ampliamente entre los diferentes grupos étnicos y países (Figura 8). Las tasas más bajas se encuentran en Asia - sobre todo en China, India y Japón - con una incidencia anual de 1,9 nuevos casos por 100.000 habitantes. En cambio, la incidencia anual de cáncer de próstata en los Estados Unidos es de 161 nuevos casos por 100.000 habitantes y los afroamericanos presentan la mayor incidencia anual, con 272 nuevos casos por cada 100.000 (Quinn and Babb 2002). En comparación con los estadounidenses de ascendencia europea, los afroamericanos presentan 1.6 veces más probabilidad de desarrollar CaP (WHO 2014).

**Antecedentes familiares:** Ya en los años 60, los estudios epidemiológicos del CaP indicaban agregación familiar de la enfermedad (Woolf 1960), lo que sugiere que el riesgo de CaP es mayor en hombres con un familiar de primer grado afectado.

Estudios posteriores de casos-controles y de cohortes confirmaron esta asociación (Eeles, et al. 1997). En la actualidad un historial familiar positivo es un factor de riesgo establecido de CaP; el RR de CaP aumenta de acuerdo con el número de miembros de la familia afectados y el grado de parentesco (Bratt 2002). En concreto, los hombres que tienen a su padre o a un hermano diagnosticado con CaP tienen 2-3 veces más riesgo de padecer la enfermedad. Si el diagnóstico tuvo lugar en torno a los 40 años de edad, el riesgo aumenta 11 veces (WHO 2014).

**Factores genéticos:** Los análisis genéticos de segregación familiar, que dominaron la genética de enfermedades complejas durante los años 90 y hasta mediados de los 2000, identificaron varios *loci* de susceptibilidad al CaP (Gillanders, et al. 2004). Asimismo, muchos estudios de asociación basados en genes-candidatos identificaron variantes genéticas adicionales (Amundadottir, et al. 2006; Klein and Silverman 2008; Zheng, et al. 2008). El mayor problema de estos estudios es la falta de reproducibilidad de los resultados en muestras independientes y su escaso significado traslacional en la práctica clínica. Por ejemplo, un estudio reciente examinó sistemáticamente 15 variantes genéticas respecto a su asociación con características clínicas y patológicas del CaP sin producir resultados significativos (Xu, et al. 2008). Los avances en el análisis genómico de los últimos diez años han permitido realizar estudios de asociación en todo el genoma (*Genome-Wide Association Studies*) para descubrir nuevas variantes de susceptibilidad al CaP (Figura 9). La gran ventaja de los *Genome-Wide Association Studies* es que son libres de hipótesis (a diferencia de los estudios de genes-candidatos), permitiendo descubrir nuevos procesos biológicos relacionados con la enfermedad y estadísticamente más robustos. A fecha de hoy, más de 70 *loci* significativos de

susceptibilidad al CaP han sido identificados gracias a esta técnica, explicando alrededor del 30 % del riesgo familiar de esta enfermedad (Olumi 2014). Por último, el descubrimiento de los oncogenes de fusión *TMPRSS2-ERG* y *TMPRSS2-ETV1* - cuya sobreexpresión se asocia con el CaP - ha supuesto un avance adicional en la búsqueda de nuevos mecanismos patogénicos de la enfermedad (Petrovics, et al. 2005).



**Figura 9:** Gráfica típica (“Manhattan Plot”) de los resultados de un *Genome-Wide Association Study* en 3,425 casos de CaP y 3,290 controles afroamericanos (Haiman, et al. 2011). Cada punto representa la posición cromosómica de una variante genética y el  $-\log_{10}$  del p-valor que ha devuelto la prueba de su asociación con la enfermedad.

**Factores epigenéticos:** La hipermetilación de residuos de citosina en el promotor de varios genes se ha asociado con el desarrollo de CaP. Un estudio previo de muestras de tejido prostático buscó patrones de hipermetilación en nueve genes asociados con la proliferación celular y su asociación con el CaP (Ellinger, et al. 2008). El estudio descubrió que la hipermetilación en múltiples *loci* se asociaba a características clínicas y patológicas del CaP. Asimismo, la hipermetilación fue mayor durante la progresión de la enfermedad e incluso podría indicar una recurrencia bioquímica precoz tras una prostatectomía radical.

**Infección e inflamación:** Evidencias epidemiológicas, genéticas y moleculares sugieren que la inflamación y la infección asociadas a la hiperproliferación contribuyen al desarrollo de CaP (Coussens and Werb 2002; Platz and De Marzo 2004). Dado que la próstata está expuesta a agentes infecciosos a través de la orina y la actividad sexual, dichos agentes podrían iniciar procesos inflamatorios y conducir a la transformación maligna del tejido prostático. Dos metaanálisis de estudios de casos-controles han descubierto asociaciones estadísticamente significativas entre el CaP y la presencia de enfermedades de transmisión sexual (RR = 1,4) y la prostatitis (OR = 1,6) (Dennis and Dawson 2002; Dennis, et al. 2002).

**Andrógenos:** Numerosos estudios prospectivos han investigado el papel de los andrógenos en el CaP, pero sólo uno de ellos demostró que los hombres con niveles séricos de testosterona elevados tenían un mayor riesgo de desarrollar CaP (Hsing 2001).

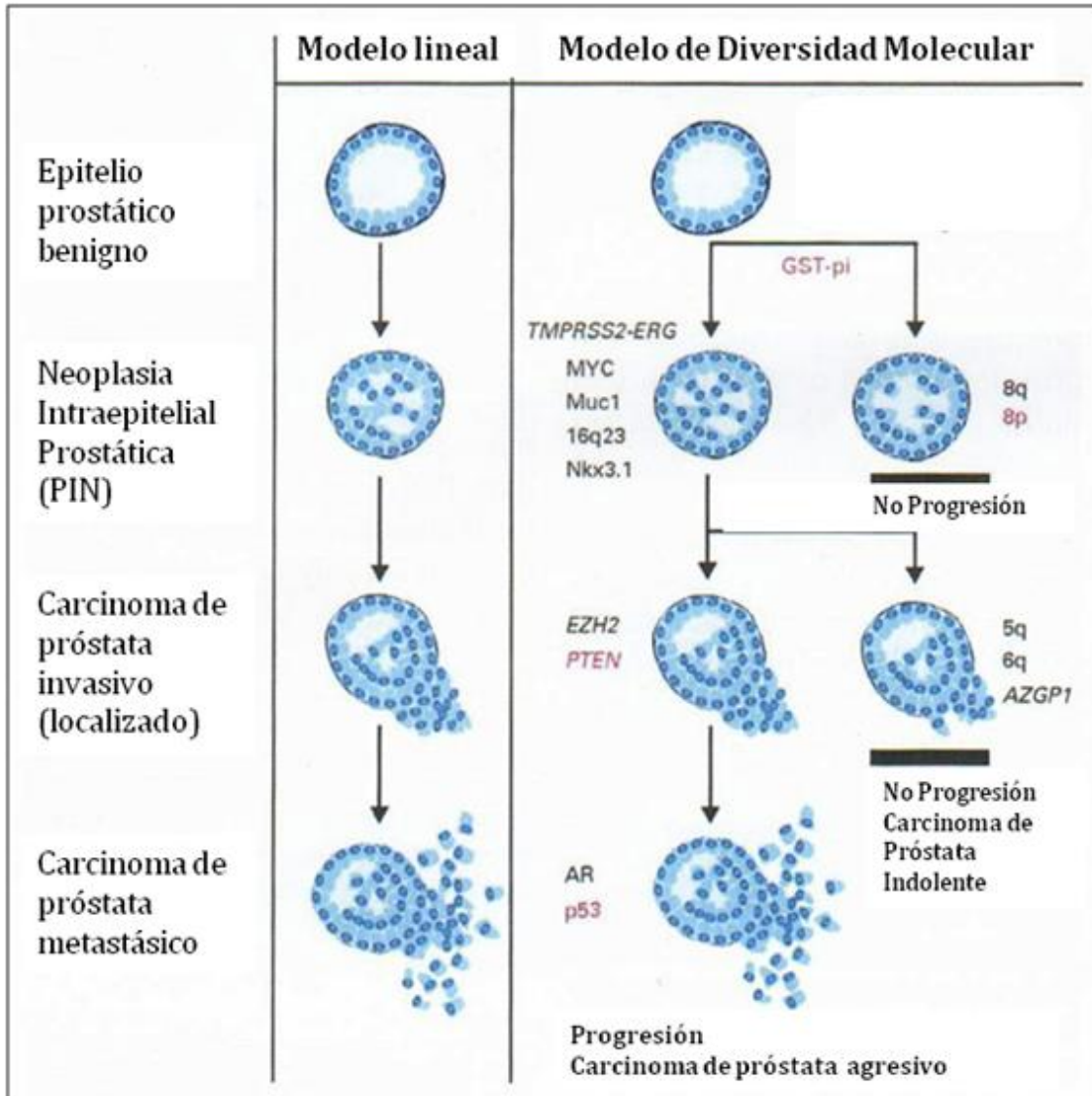
***Dieta y ejercicio:*** Los factores dietéticos pueden contribuir al riesgo de CaP. Por ejemplo, existe una correlación significativa entre la incidencia global del CaP y la media de ingesta de grasas (Bostwick, et al. 2004). Además, se ha sugerido que la obesidad (reflejada en el índice de masa corporal) podría ser un factor de riesgo adicional, pero los datos que apoyan esta asociación han sido inconsistentes y son necesarios más estudios para llegar a una conclusión sólida.

***Estilo de vida:*** Como ya se ha mencionado, la actividad sexual podría exponer la próstata a agentes infecciosos. Algunos estudios reportan un incremento en el riesgo de CaP asociado con las relaciones sexuales a una edad temprana y un alto número de parejas sexuales, aunque los resultados no son consistentes entre estudios (Giles, et al. 2003). Por otro lado, se ha reportado que la eyaculación frecuente tiene un efecto protector contra el cáncer de próstata, aunque se desconoce la base biológica de este efecto.

### **3.2.4 MECANISMOS MOLECULARES**

En comparación con otras neoplasias comunes, las causas del CaP siguen siendo poco conocidas. Aun así, como se comentó anteriormente, los avances en la genética y biología molecular indican que la iniciación y progresión del CaP se debe tanto a factores genéticos como ambientales. Según los últimos hallazgos científicos, la progresión no es lineal, sino que presenta bifurcaciones. En este *modelo de diversidad molecular*, no todas las vías resultan en progresión. La acumulación de alteraciones, como la sobreexpresión del gen *EZH2* o mutaciones en el gen *PTEN*, puede resultar en enfermedad invasiva, mientras que otras

alteraciones se observan con mayor frecuencia en la enfermedad indolente (Figura 10).



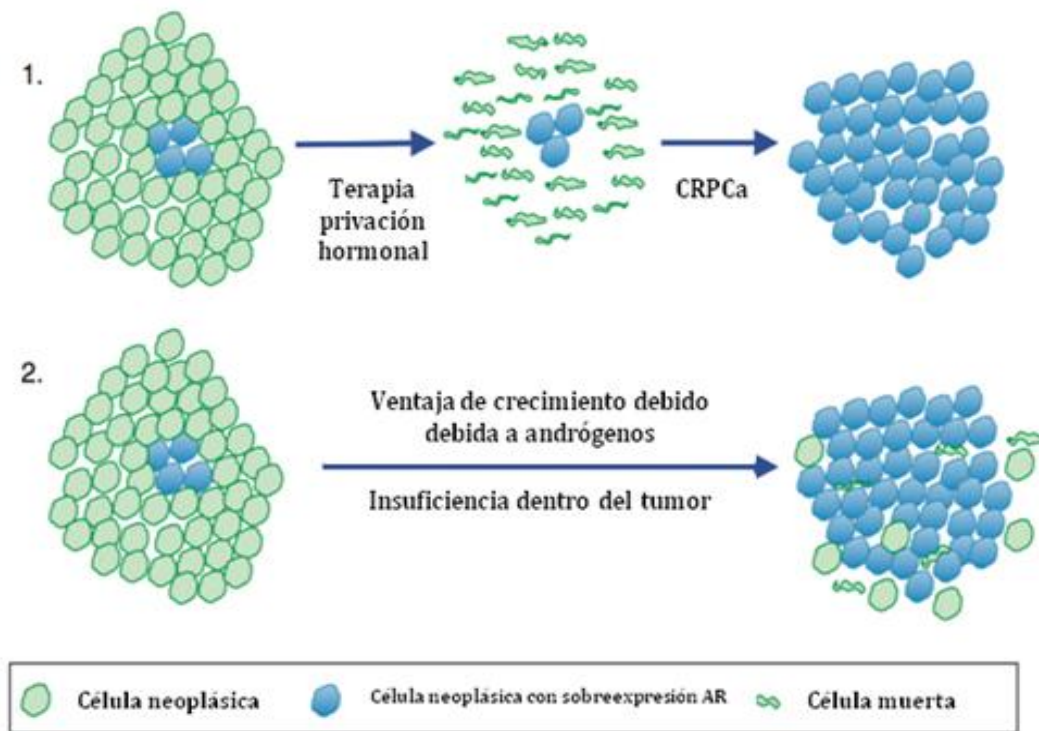
**Figura 10: Comparación esquemática del modelo lineal de la progresión del CaP con el modelo de diversidad molecular. (Modificado de (WHO 2014)).**

A continuación, se mencionarán de manera no exhaustiva algunos mecanismos moleculares que están implicados en el desarrollo del CaP:

***Pérdida/silenciamiento de genes supresores de tumores:*** Muchos estudios han detectado pérdida de genes que codifican por supresores tumorales en diversas regiones cromosómicas en las fases iniciales del desarrollo de CaP. La supresión tumoral también está relacionada con el transporte de zinc. El gen *SLC39A1* codifica por un supresor tumoral denominado ZIP1. La proteína ZIP1 es responsable del transporte activo de zinc en células prostáticas. Una de las funciones más importantes de zinc es modificar el metabolismo celular a fin de producir citrato, un componente importante del semen. En general, las células malignas están desprovistas de zinc y utilizan la energía que se ahorran de no producir citrato para crecer y extenderse. Se cree que la ausencia de zinc ocurre mediante un silenciamiento epigenético del gen *SLC39A1*, aunque el mecanismo exacto de momento se desconoce (Costello and Franklin 2006). Otros genes supresores de tumores que desempeñan un papel en el CaP incluyen el *PTEN* y el *KAI1*. Hasta un 70% de pacientes con CaP han perdido una copia del *PTEN* en el momento del diagnóstico (Chen, et al. 2005).

***Alteraciones de la apoptosis:*** El inhibidor de apoptosis XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis*) promueve la supervivencia y el crecimiento de las células malignas de la próstata. Actualmente éste inhibidor es objeto de investigación intensiva porque, cuando está desactivado, la cascada de la apoptosis puede reanudar su función en la prevención de la proliferación de células malignas (Watanabe, et al. 2010). Por otro lado, la citoquina MIC-1 (*Macrophage Inhibitory Cytokine-1*) estimula la vía de señalización de quinasa de adhesión focal (FAK), resultando en el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas de la próstata (Senapati, et al. 2010).

***El papel del receptor de andrógenos y otras proteínas de la membrana:*** Un tratamiento convencional del CaP se basa en la privación de andrógenos, ya que la proliferación y supervivencia de las células prostáticas dependen de estas hormonas. La privación hormonal se puede conseguir a través de una castración química que reducirá los niveles de testosterona o con la inhibición del receptor de andrógenos (AR). Sin embargo, la inhibición del AR sólo se ha demostrado eficaz en estudios en ratones (Narizhneva, et al. 2009). Lo que se observa en humanos es una remisión inicial, seguida de modo casi invariable por una recaída de la enfermedad conocida como *CaP resistente a la castración* (CRPCa). El CRPCa se caracteriza por una hipersensibilidad de la vía de señalización de andrógenos debido a la amplificación del gen *AR* o la aparición de mutaciones activadoras en el mismo. Un estudio reciente mostró que el desarrollo de pequeños focos de células malignas que contienen un número elevado de copias del *AR* tiene lugar antes de la terapia de privación hormonal (Merson, Yang, Brewer, Olmos, Eichholz, McCarthy, Fisher, Kovacs, Berney, Foster, Moller, Scardino, Cuzick, Cooper and Clark 2014). Según el mismo estudio, estos focos clonales podrían ser seleccionados en su evolución por la terapia de privación de andrógenos o la insuficiencia de andrógenos natural dentro del ambiente del tumor (Figura 11). En ambos casos, el resultado es la proliferación de un tumor con alto contenido en células resistentes a la castración.



**Figura 11:** La selección de focos clonales de células prostáticas cancerosas bien por terapia de privación de andrógenos o por insuficiencia de andrógenos en el entorno tumoral. (Modificado de (Merson, Yang, Brewer, Olmos, Eichholz, McCarthy, Fisher, Kovacs, Berney, Foster, Moller, Scardino, Cuzick, Cooper, Clark, et al. 2014)).

### 3.2.5 PATOLOGÍA DEL ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA

En aproximadamente el 70% de los casos, el CaP se origina en la zona periférica de la glándula, clásicamente en una localización posterior que puede ser palpable en una exploración rectal en tumores de suficiente tamaño y consistencia. La diseminación de CaP se produce por invasión local directa y a través del torrente sanguíneo y linfático. La extensión local afecta comúnmente a las vesículas seminales y a la base de la vejiga urinaria, lo que puede dar lugar a una obstrucción uretral (Potter, et al. 2000).

Las características microscópicas del adenocarcinoma acinar que permiten distinguirlo de las lesiones benignas prostáticas y, por tanto, establecer el diagnóstico de malignidad, se describen brevemente a continuación:

**Características arquitectónicas:** En comparación con los tejidos prostáticos benignos, el CaP contiene mayor densidad de glándulas en relación con el estroma y distribuidas de forma anárquica perdiendo el dibujo acinar o lobulado del parénquima normal. Se observan glándulas orientadas perpendicularmente entre sí o irregularmente separadas por cantidades variables de tejido conectivo y músculo liso adoptando una estructura de apariencia infiltrativa. Las glándulas malignas son, en general, de menor tamaño que las normales y que las hiperplásicas y la presencia de glándulas de pequeño diámetro en el intersticio entre glándulas benignas de mayor tamaño se considera un criterio de invasión que apoya el diagnóstico de malignidad.

Otra característica esencial en la estructura glandular es la pérdida del estrato celular basal, que suele ponerse especialmente de manifiesto con técnicas de inmunohistoquímica como se comentará más adelante.

**Características citológicas:** Los núcleos celulares en el CaP varían entre los que son indistinguibles de los que corresponden a alteraciones benignas y los que manifiestan una malignidad indudable. En general, cuanto más aberrantes son las características arquitectónicas, más atípicos se muestran los núcleos del CaP. Son características de malignidad el aumento de tamaño nuclear con incremento del cociente núcleo/citoplasma, el hiperchromatismo y el pleomorfismo nuclear. Un hallazgo muy característico es la presencia de nucleolos, el aumento de su tamaño

(macronucleolos) y su desplazamiento a la zona periférica del núcleo, por debajo de la membrana nuclear. La presencia conjunta de estos tres criterios en células benignas es excepcional. A diferencia de las glándulas benignas, las del CaP tienden a tener un borde luminal citoplasmático nítido y agudo, sin ondulaciones. La textura y tinción del citoplasma celular puede también modificarse adoptando a veces un aspecto más denso y basófilo. Otras veces el citoplasma es claro como en las glándulas hiperplásicas. Por último, el citoplasma de células prostáticas malignas carece de lipofuscina, comparado con las células benignas (Brennick, et al. 1994).

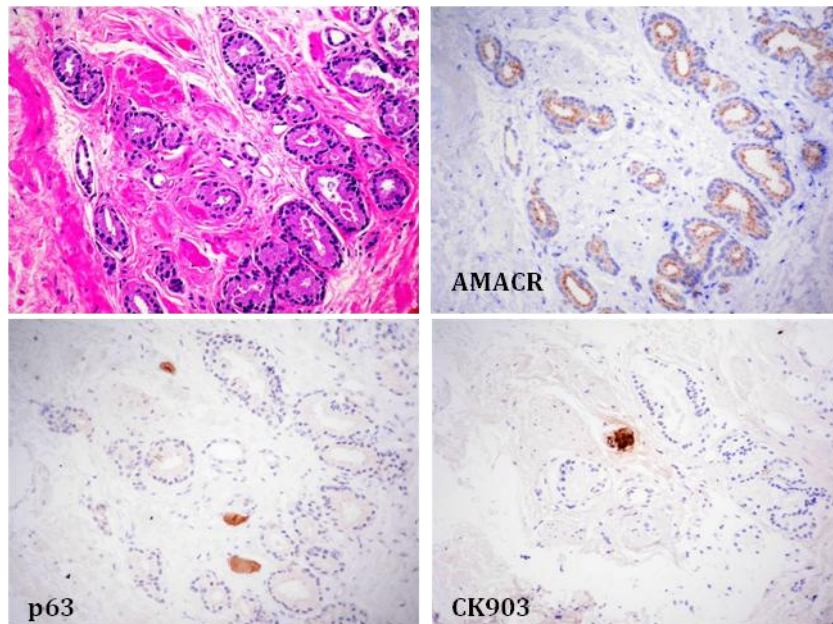
**Contenido intraluminal glandular:** Una característica común en el CaP, especialmente en el de bajo grado, es la presencia de *cristaloides prostáticos*, unas estructuras eosinófilas densas que adoptan diversas formas geométricas. Estos cristaloides son mucho más frecuentes en el CaP que en las glándulas benignas. Las secreciones intraluminales densas, de afinidad tintorial variable, son también mucho más frecuentes en CaP, también preferentemente en los de bajo grado.

**Características estromales:** El adenocarcinoma acinar común carece de una respuesta estromal desmoplásica o mixoide y no suele acompañarse de infiltrado inflamatorio en el estroma. En general, la evaluación del estroma no suele ser útil en el diagnóstico del CaP.

**Características inmunohistoquímicas:** La expresión inmunohistoquímica de distintas proteínas de localización nuclear o citoplasmática resulta de gran utilidad para el diagnóstico de malignidad prostática. En la práctica clínica, se presentan

diferentes escenarios en los que la inmunohistoquímica resultara una herramienta esencial:

- Diagnóstico de malignidad en biopsias de próstata: Con esta finalidad son de especial utilidad los anticuerpos dirigidos contra citoqueratinas de alto peso molecular que marcan de manera específica las células del estrato basal glandular, al igual que la proteína p63 (Figura 12). La pérdida de expresión de estos marcadores demuestra ausencia de estrato basal y se interpreta como criterio de invasión y, por tanto, de malignidad. Otros marcadores de interés en el diagnóstico de malignidad son la alfa-metilcil-coenzima A-racemasa (AMACR), presente en el citoplasma de las células malignas prostáticas y raramente en condiciones benignas, y el producto del gen ERG que, aunque sólo se expresa en aproximadamente el 50% de los adenocarcinomas prostático, es altamente específico.



**Figura 12: Secciones de un carcinoma de próstata teñido con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica con los anticuerpos AMACR que muestra positividad citoplasmática y evidencia de negatividad con p63 y CK903 demostrativas de pérdida del estrato basal. (200X).**

Los distintos marcadores comentados son de especial utilidad en casos de diagnóstico diferencial complejo entre benignidad y malignidad en el estudio de biopsias que determinará la actuación terapéutica posterior. Esto sucede en casos de lesiones poco representadas en las muestras o con criterios de sospecha pero no de certeza. Con el empleo de un panel inmunohistoquímico completo podemos reducir los casos con diagnóstico, no concluyente, como los que etiquetamos con el término “proliferación microacinar atípica” comentado previamente (3.1.2.3.)

- Diagnóstico de origen prostático en un adenocarcinoma metastático: El PSA, además de emplearse como un biomarcador sérico (véase más adelante), también se utiliza en inmunohistoquímica sobre secciones

tisulares para establecer el origen prostático de un adenocarcinoma. Puede estar presente en otras neoplasias glandulares como las anexiales cutáneas pero que normalmente presentan un contexto clínico muy distinto. En la práctica, por tanto, el PSA resulta de especificidad suficiente. Su sensibilidad, en cambio, aunque puede variar con el anticuerpo empleado, es mejorable. Como complemento del PSA y con una utilidad parecida, puede utilizarse la fosfatasa ácida protática (HPAP), presente también en el citoplasma de las células malignas prostáticas. También en este escenario puede ser de utilidad el producto del gen ERG, un marcador nuclear propuesto recientemente como altamente específico de origen prostático (Verdu, et al. 2013).

Además del adenocarcinoma acinar, existen otros tipos de carcinomas de incidencia muy inferior, que se describen brevemente a continuación:

***Adenocarcinoma ductal:*** Es un subtipo de adenocarcinoma compuesto por glándulas grandes revestidas por células columnares altas pseudoestratificadas. En su forma pura, el adenocarcinoma ductal comprende el 0.2-0.8% de los CaP. Se localiza alrededor de la uretra prostática, pero se mezcla frecuentemente con el adenocarcinoma acinar.

***Carcinoma urotelial:*** Se trata de un subtipo de carcinoma que normalmente se origina y se encuentra dentro de los conductos prostáticos proximales y se caracteriza por la diferenciación hacia urotelio o epitelio transicional. Es indistinguible, por tanto, de los carcinomas uroteliales de otras localizaciones más frecuentes como el de vejiga urinaria. Muchos casos son localmente avanzados en

el momento del diagnóstico. La frecuencia de este subtipo varía entre el 0.7 y el 2.8% de los tumores prostáticos.

***Carcinoma escamoso:*** La incidencia de diferenciación escamosa en los carcinomas prostáticos es muy baja (inferior al 0.6%). Se originan en las glándulas periuretrales o en los acinos glandulares de la próstata.

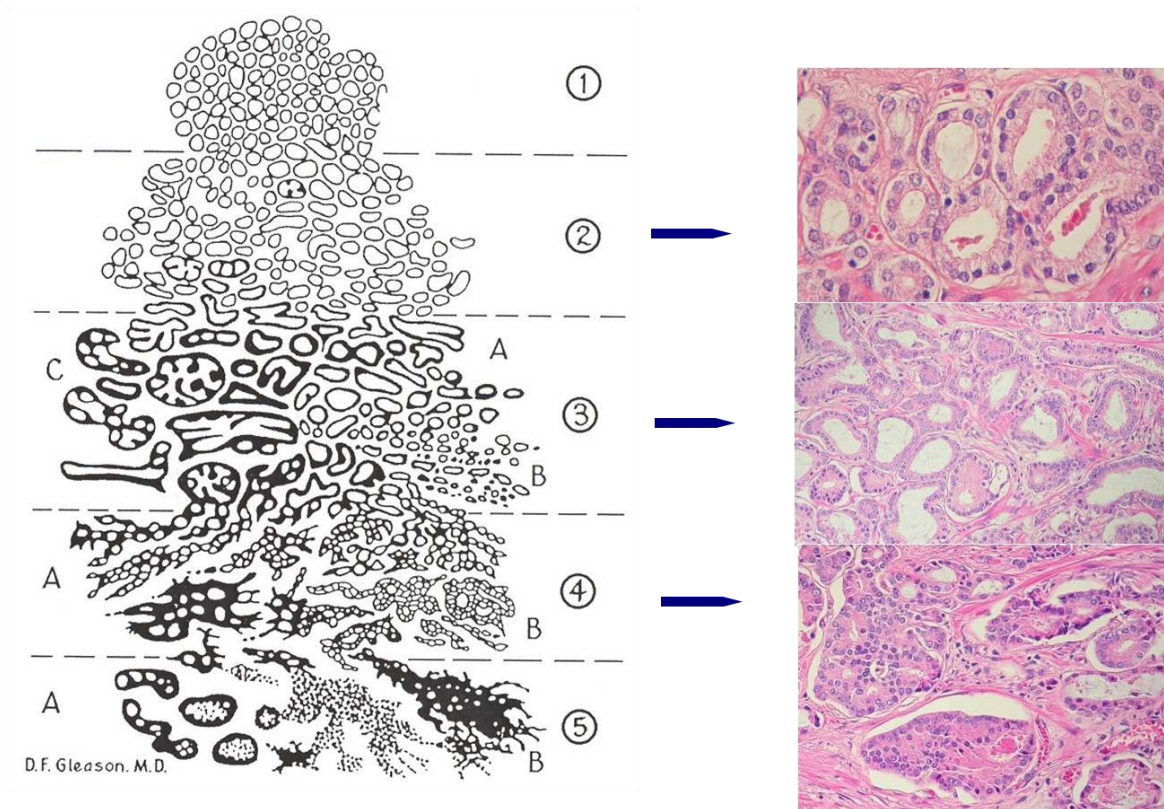
***Carcinoma de células basales:*** Es una neoplasia maligna, también muy infrecuente, compuesta por células basales de las glándulas prostáticas. Se cree que en algunos casos las células basales pueden dar lugar a un espectro de lesiones proliferativas que varían desde una hiperplasia hasta un carcinoma de células basales.

***Carcinoma neuroendocrino:*** La presencia de diferenciación neuroendocrina en el carcinoma de próstata puede aparecer formando parte, como componente minoritario, de un adenocarcinoma convencional o dominando el fenotipo morfológico como en el caso del carcinoma neuroendocrino, o de células pequeñas, de origen prostático.

### **3.2.5.1 GRADO DE GLEASON**

El grado de Gleason original fue desarrollado en el año 1966 por Donald F. Gleason quien publicó por primera vez un sistema de clasificación del CaP basándose exclusivamente en el patrón arquitectónico microscópico del tumor, sin considerar los detalles citológicos. Gleason definía cinco patrones. Los tres primeros representaban los tumores que más se asimilaban a la arquitectura del

parénquima normal y los patrones 4 y 5 presentaban una arquitectura glandular más aberrante (Gleason 1966) (Figura 13).

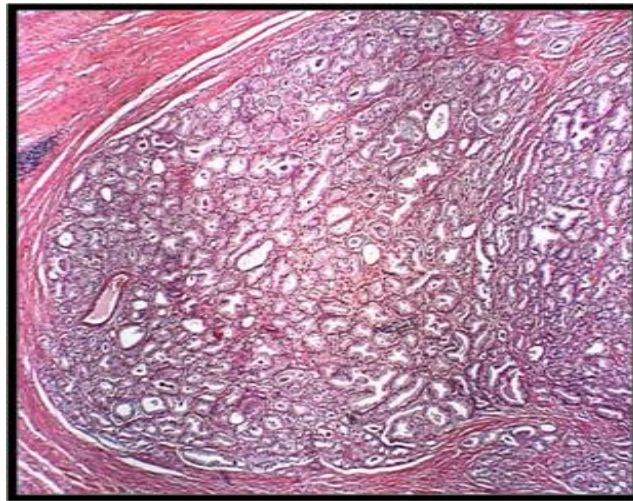


**Figura 13: El diagrama original del grado de Gleason, dibujado por él, y su correspondencia con secciones tisulares teñidas con hematoxilina-eosina.**

A continuación se detallan las características principales de cada uno de los patrones:

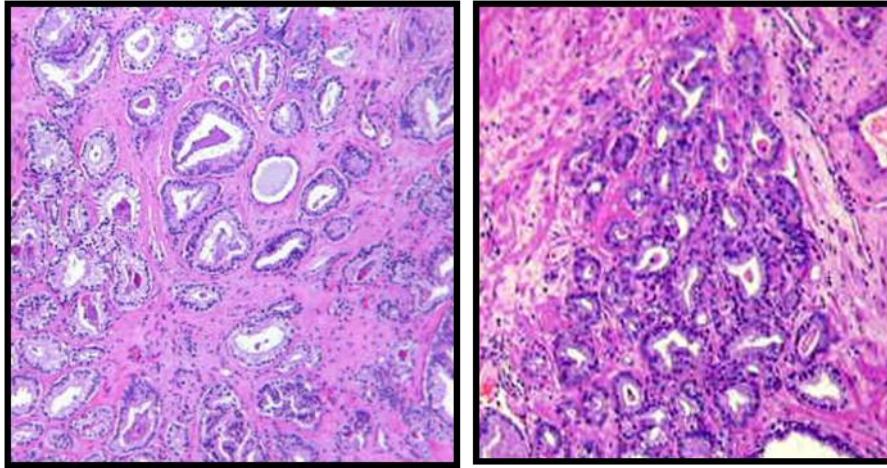
**Patrón 1:** Se compone de una masa de glándulas adosadas de crecimiento expansivo que aparece como nódulos muy bien circunscritos de glándulas uniformes y próximas entre sí, estrechamente empaquetadas. Las glándulas son de tamaño intermedio y muy parecidas entre sí en tamaño y forma (Figura 14).

**Patrón 2:** Se compone de nódulos de glándulas similares a los del patrón Gleason 1. Las glándulas son redondas u ovals con extremos lisos, están ordenadas de manera más flexible y no son tan uniformes en tamaño y forma como las de patrón de Gleason 1. Pueden verse algunas glándulas dispersas en la periferia de los nódulos (Figura 14).



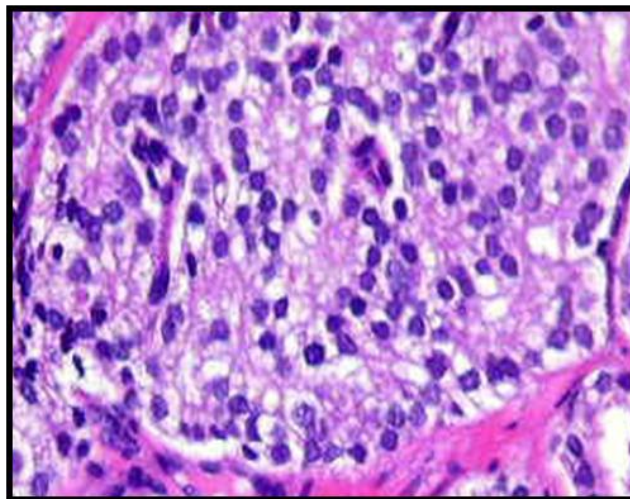
**Figura 14: Patrón de Gleason 1-2 (Hematoxilina-Eosina, 100X).**

**Patrón 3:** Este patrón es el más común. Las glándulas son de patrón más claramente infiltrante, la distancia entre ellas es mayor y más variable que en los patrones 1 y 2. El tamaño y forma de las glándulas también son más variables y con frecuencia tienen forma angular. Las glándulas típicas del patrón 3 son pequeñas, pero también puede haber glándulas grandes e irregulares. Cada glándula tiene un lumen abierto y está circunscrita por estroma (Figura 15).



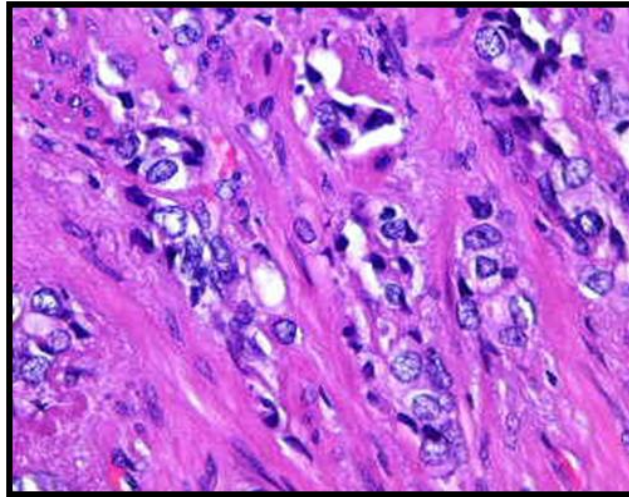
**Figura 15: Patrón de Gleason 3 (Hematoxilina-Eosina, 100X).**

**Patrón 4:** En este patrón, las glándulas aparecen interfusionadas, pueden presentar estructuras cribiformes o límites imprecisos. La fusión de las glándulas comporta que no siempre encontramos estroma intermedio entre ellas. Las glándulas cribiformes de patrón 4 son grandes, pueden ser irregulares y con bordes indentados (Figura 16).



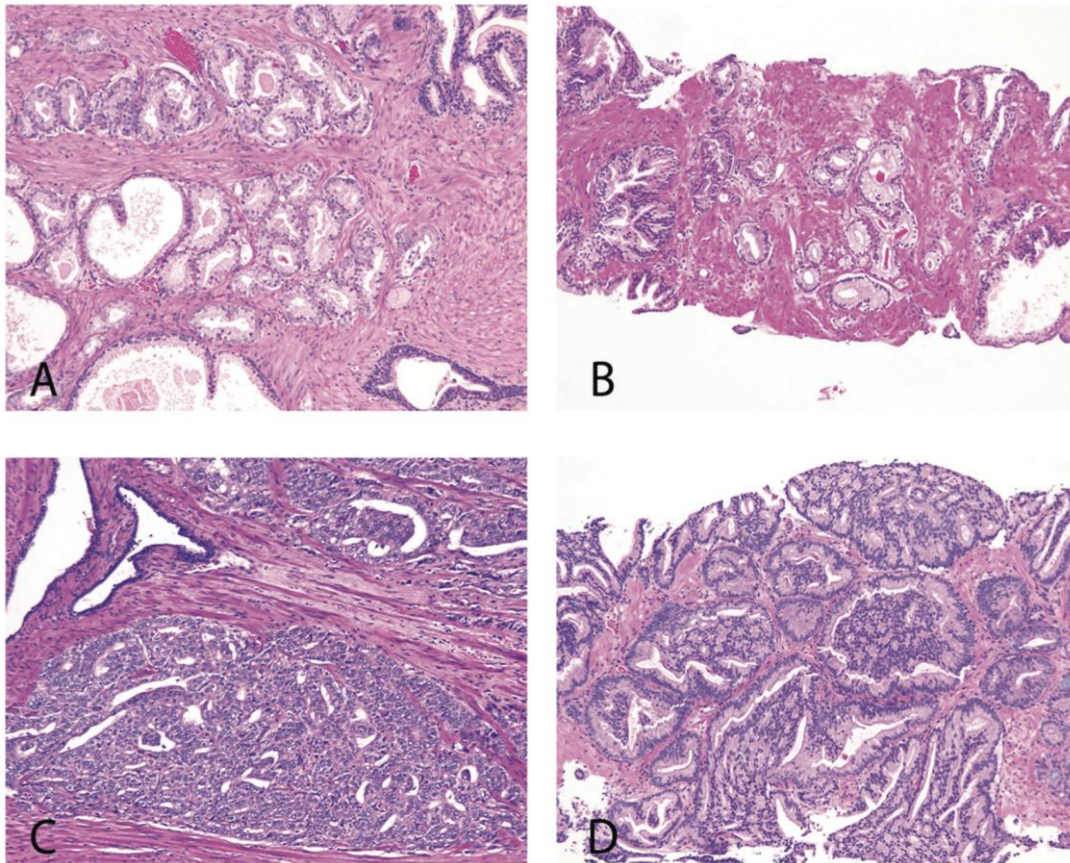
**Figura 16: Patrón de Gleason 4 (Hematoxilina-Eosina, 400X).**

**Patrón 5:** En el patrón de Gleason 5, hay una pérdida completa o casi completa de la diferenciación glandular. El epitelio forma láminas sólidas, hebras sólidas o células individuales que invaden el estroma (Figura 17).



**Figura 17: Patrón Gleason 5 (Hematoxilina-Eosina, 400X).**

Para establecer el grado de diferenciación en un adenocarcinoma de próstata se emplea el denominado Grado de Gleason que es la suma de los dos patrones predominantes en el tejido estudiado. Se representa como un sumatorio de los patrones más representados en el tumor poniendo en primer término el patrón predominante y el patrón secundario a continuación. Por ejemplo, el grado 7 puede resultar de un sumatorio 3+4 ó 4+3 dependiendo del patrón predominante. En aquellos tumores en los que el patólogo sólo observa un único patrón, el grado se representa como el sumatorio del mismo, por ejemplo, 4+4 que resultará en un grado 8 o 3+3 que corresponde a un grado 6 (Figura 18).



**Figura 18: A y B, CaP con grado *Gleason* (3 + 3). C, CaP con grado *Gleason* (4 + 4). D, CaP con grado *Gleason* (4 + 3) (Hematoxilina-Eosina, 100X).**

A lo largo de los años 70, la escala de Gleason fue ampliada y perfeccionada, proporcionando descripciones mejores y más detalladas de los cinco patrones histológicos (Gleason and Mellinger 1974; Mellinger 1977). En el año 2005, la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) convocó una conferencia en San Antonio, Tejas, con tal de lograr un consenso en las áreas controvertidas de la escala de Gleason. Esa conferencia dio lugar a un sistema revisado, *la escala Gleason ISUP 2005* (Epstein, et al. 2005). En el diagnóstico de CaP en biopsias por aguja recomendaron que el uso de los patrones de Gleason 1 y 2 fuera excepcional, es decir, que no se usara de manera rutinaria asignando siempre, como mínimo, un

patrón 3 (grado de Gleason 6) aunque la representación tumoral fuera muy escasa. El objetivo de esta recomendación es intentar evitar el infraestadiaje observado en los CaP diagnosticados en biopsia respecto al grado de Gleason que se reporta cuando se estudia el mismo tumor en una prostatectomía posterior.

Así, en una biopsia se recomienda reportar como mínimo un grado 6 (3+3).

Otro cambio fue la limitación de la definición del patrón 3 y la ampliación de la definición del patrón 4. El resultado primario de este cambio fue un “traslado” de grados de *Gleason* tanto en biopsias como en prostatectomía radical. Las consecuencias clínicas de la revisión de la escala de Gleason fueron reflejadas en el tipo de tratamiento que se aplica a los pacientes con CaP (Montironi, et al. 2010). La verdadera prueba de la validez de *la escala Gleason ISUP 2005* es su correlación con los resultados del paciente (Uemura, et al. 2009), demostrando que la escala revisada sea clínicamente útil para determinar los tratamientos más adecuados para los pacientes con CaP.

En la práctica clínica, se considera que los CaP con un grado de *Gleason* menor a 7, son tumores indolentes, es decir poco agresivos y de crecimiento lento, susceptibles de ser seguidos mediante vigilancia activa y en los que se descartan tratamientos agresivos. En cambio los CaP con un grado de *Gleason* igual o superior a 7 se consideran tumores agresivos en los que son precisos tratamientos invasivos como la radioterapia, la crioterapia o la prostatectomía.

En resumen, la escala de Gleason es un sistema de clasificación del CaP que establece la agresividad de la neoplasia y su capacidad evolutiva, basándose en la

arquitectura microscópica observada en una biopsia o en la pieza de resección quirúrgica.

Casi 40 años después de su creación, la escala de *Gleason* sigue siendo uno de los factores pronósticos más sólidos y validados del CaP.

### **3.3 DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO PRECOZ DEL CARCINOMA DE PRÓSTATA: PROTOCOLO DE CRIBADO**

Dado que el CaP en fases iniciales es totalmente asintomático y que cuando causa síntomas ya se encuentra generalmente en un estadio avanzado, el cribado en población asintomática se considera de gran importancia. En muchos países desarrollados, las campañas de cribado se realizan con el fin de reducir la tasa de mortalidad a través de una detección temprana del CaP. Las dos herramientas esenciales, clásicamente utilizadas en el cribado, son el tacto rectal en el contexto de la exploración urológica y el análisis de PSA en suero desde su descubrimiento e introducción en las últimas décadas del siglo XX.

#### **3.3.1 EL ANTIGENO PROSTATICO ESPECÍFICO (PSA)**

El Antígeno Prostático Específico (PSA) es una glicoproteína sintetizada exclusivamente por las células epiteliales de la próstata. Su función principal es la disolución del coágulo seminal, facilitando la movilidad de los espermatozoides. En pacientes con patología prostática, benigna o maligna, puede pasar PSA del citoplasma celular a la circulación sanguínea. La cuantificación del PSA en el suero se usa en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del CaP - tanto localizado como metastásico - y en otras enfermedades como la prostatitis.

Los valores de referencia para el PSA sérico varían según los distintos laboratorios, el grupo étnico y la edad. Asimismo, la producción de PSA depende de la presencia de andrógenos y del volumen prostático. En general, en hombres sanos, los niveles normales del PSA sérico no superan los 4 ng/ml. Unos niveles plasmáticos de PSA entre 4 y 10 ng/ml – franja que se conoce como la “zona gris” del diagnóstico (Placer and Morote 2011) pueden producirse por diversas alteraciones de la próstata incluido un proceso maligno, por lo que se suele aconsejar una biopsia prostática. No obstante, no existe consenso sobre el valor del límite inferior de normalidad del PSA debido a que el porcentaje de biopsias de próstata positivas depende también del número de cilindros que se extraen. Históricamente el límite inferior se establecía en 4ng/ml y se estimaba que el 30% de las biopsias de próstata realizadas a pacientes con PSA entre 4 y 10ng/ml serían positivas. La *European Urological Association* propone bajar el límite inferior debido a que estiman en un 26,9 el porcentaje de pacientes con PSA entre 3,1 y 4ng/mL que tienen un cáncer de próstata (Filella, et al. 2007). En un estudio realizado sobre 914 pacientes con niveles de PSA entre 2,6 y 4 ng/mL, se detecta una tasa de cáncer de próstata del 22% (Catalona, et al. 1997). El *National Comprehensive Cancer Network* (NCNN) recomienda practicar una biopsia de próstata cuando la concentración de PSA es superior a los 2.5 ng/mL.

Por último, los niveles de PSA superiores a 10 ng/ml se consideran sospechosos de neoplasia maligna y requieren la indicación de biopsia.

El análisis del PSA sérico fue aprobado por la *Food and Drug Administration* de Estados Unidos en 1986 y su uso para la detección precoz de CaP ha aumentado

considerablemente desde mediados de la década de los 90 (Farwell, et al. 2007). El empleo del PSA en el diagnóstico en las últimas dos décadas ha contribuido en la detección temprana del CaP y a la vez ha reducido drásticamente la proporción de pacientes que se diagnostican con enfermedad avanzada, y de acuerdo con algunos estudios, ha reducido también la mortalidad por CaP (Placer and Morote 2011).

Sin embargo, el análisis de PSA no es específico para el CaP, pues otras alteraciones prostáticas capaces de lesionar el parénquima glandular, como la HPB y la prostatitis, también aumentan sus niveles plasmáticos. Para mejorar la sensibilidad y especificidad del análisis del PSA en suero, se han utilizado diferentes parámetros derivados del PSA como la densidad, la velocidad, el tiempo de duplicación y el porcentaje de PSA libre (Aus, et al. 2005; Catalona, et al. 1998; Catalona, et al. 1994; Fang, et al. 2002). De hecho, la determinación del porcentaje de PSA libre (índice PSA) y de la densidad del PSA aumentan de forma significativa la especificidad del estudio en el diagnóstico del CaP. Por otro lado, la velocidad y el tiempo de duplicación del PSA tienen aplicaciones en el pronóstico del CaP (Placer and Morote 2011).

### **3.3.2 EL TACTO RECTAL**

El tacto rectal es una exploración médica especialmente útil en la patología de la próstata. Consiste en la exploración anatómica de la cara posterior de la glándula mediante su palpación digital transrectal evaluando tamaño, forma y consistencia.

Esta exploración se utiliza rutinariamente en el examen urológico pero su sensibilidad para la detección de CaP en estadio incipiente es baja, e inferior al

estudio del PSA en suero. El empleo conjunto de tacto rectal y PSA, aunque ambos recursos tienen importantes limitaciones, es lo que permite clásicamente al urólogo tomar sus decisiones en el contexto clínico de los pacientes, para su seguimiento y tratamiento.

### **3.4 PROBLEMÁTICA EN DISCUSIÓN DEL CRIBADO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA: SOBREDIAGNÓSTICO Y SOBRETAMIENTO**

El uso generalizado del análisis del PSA en suero para la detección precoz del CaP en población asintomática ha resultado en un notable aumento del número de biopsias prostáticas, del volumen de casos diagnosticados en fases iniciales y del número de pacientes tratados. No obstante, transcurridas más de dos décadas desde la implementación del cribado en pacientes asintomáticos, la experiencia clínica acumulada y los múltiples análisis estadísticos en distintos países han puesto de manifiesto y han reflejado extensa y repetidamente en la literatura de los últimos años dos problemas relevantes, el sobrediagnóstico y el sobretamiento. Esta problemática, aunque se ha focalizado especialmente en el cáncer de próstata, no es exclusivo de esta neoplasia, También se ha evidenciado en otras formas de cáncer sometidas también a campañas de cribado de población asintomática desde hace años, como el carcinoma de mama (Etzioni, et al. 2013), y se replicará probablemente en el futuro, en otras neoplasias en las que se están iniciando campañas de cribado como el carcinoma de pulmón (Moyer and Force 2014).

El primer problema que genera el cribado con PSA es debido a su baja especificidad para el CaP. Como ya se ha comentado, alteraciones benignas de la próstata (como la HPB y la prostatitis) son muy frecuentes en varones de más de 50 años y conllevan, al igual que en el CaP, una elevación del PSA.

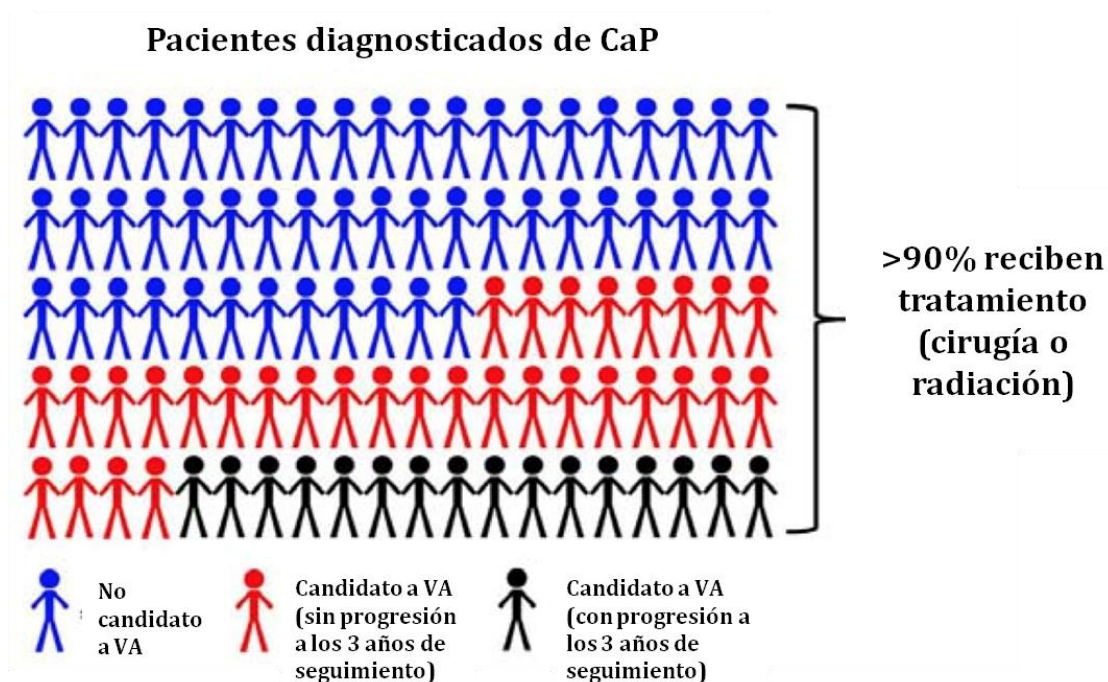
Dada la edad de la población que se somete al cribado de CaP es muy habitual encontrar pacientes asintomáticos con niveles de PSA en la zona gris de diagnóstico. En este grupo de pacientes la sospecha de que exista un CaP provoca un sobrediagnóstico y la indicación de realizar una biopsia prostática. En la mayoría de los casos, la biopsia será negativa y lo seguirá siendo repetidamente aunque los niveles de PSA persistan.

Se estima que el 75% de todas biopsias prostáticas indicadas en pacientes en la “zona gris del PSA” resultan negativas (Schroder, et al. 2009).

Se consideran pacientes con sobrediagnóstico los que se diagnostican de CaP pero con bajo potencial de agresividad biológica, que no compromete su esperanza de vida y que permanecerían asintomáticos. De entre ellos, muchos son sometidos al tratamiento oncológico radical convencional del CaP con cirugía, radioterapia u otras modalidades. Estos constituyen el subgrupo de pacientes con sobretratamiento asumiendo que, reemplazando el tratamiento por seguimiento clínico, no se produciría progresión de la enfermedad. La naturaleza del CaP y su potencial agresivo es muy variable y, como demuestran diversos estudios, en un porcentaje elevado de los casos (25-80%) (Draisma, et al. 2009; Gulati, et al. 2014), se trata de carcinomas con grado de Gleason no superior a 7, asintomáticos o clínicamente ocultos, con bajo potencial agresivo, en los que la capacidad de

progresión y manifestación clínica es muy dudosa. Por otra parte, la gran mayoría de pacientes diagnosticados de CaP oculto son de edad avanzada (Baumann and Behbahani 2012), con esperanza de vida limitada, que limita a su vez el riesgo de manifestación clínica de una patología con baja agresividad biológica y evolución lenta.

En una revisión reciente de series de autopsias (N = 320), se ha reportado el hallazgo incidental de CaP oculto durante la autopsia en el 37.3% de sujetos de ascendencia europea (edad media = 62.5) y en el 35% de sujetos de ascendencia asiática (edad media = 68.5). El mismo estudio mostró la presencia de CaP oculto en el 40% de las próstatas examinadas en hombres mayores de 60 años, llegando casi al 60% a partir de los 80 años (Zlotta, et al. 2013). Estas neoplasias no producen sintomatología ni comprometen la vida del paciente, pero son capaces de elevar el PSA sérico y desencadenar el protocolo clínico de biopsia y tratamiento quirúrgico primario (Figura 17). Este *sobretratamiento*, por tanto, no mejora la esperanza de vida del paciente (Wilt, et al. 2012), pero en cambio, le somete a los efectos del tratamiento oncológico y genera costes económicos innecesarios (Stephenson, et al. 2009) (Figura 19).



**Figura 19:** La gran mayoría de los pacientes de CaP o no son candidatos a vigilancia activa (VA) (azul) o potencialmente lo son, pero sin progresión de la enfermedad (rojo). Sólo el 30% de los candidatos a vigilancia activa tendrá progresión aparente (negro). Aún así, más del 90% de estos pacientes se someten de entrada a un tratamiento radical (Modificado de Rubin M et al., 2014, International Society of Urologic Pathology Meeting 2014).

Actualmente existe consenso sobre la problemática que genera el cribado del CaP basado en el análisis del PSA sérico. Las publicaciones más relevantes que han contribuido a llegar a esta situación se detallan cronológicamente a continuación.

En el año 2002 la Agencia Norteamericana de Medicina Preventiva (*United States Preventive Services Task Force*), tras revisar toda la información sobre los resultados del cribado de CaP con PSA publicó un artículo en el que concluían que la evidencia existente en ese momento era insuficiente para recomendar o

desaconsejar el uso del PSA y el tacto rectal en el cribado de CaP (recomendación de grado I) (Force 2002).

En el año 2008 la misma agencia publicó una actualización de sus datos de 2002 en la que seguía afirmando que la evidencia existente para el uso del PSA en el cribado de CaP era insuficiente, matizando que la recomendación aplicaba al grupo de pacientes menores de 75 años. En los pacientes mayores de 75 años se desaconsejaba el cribado con PSA (recomendación de grado D)(Force 2008).

En el año 2009 se publicaron dos grandes estudios independientes que fueron los primeros en poner de relieve los inconvenientes que genera el cribado con PSA frente al beneficio de una posible reducción de mortalidad: el estudio PLCO y el estudio ERSPC.

El estudio PLCO (*Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer*), se realizó en diez centros de Estados Unidos y enroló a más de 76.000 pacientes que fueron randomizados aleatoriamente a un brazo en el que eran sometidos a un estudio anual con PSA (durante 6 años) y examen digital rectal (durante 4 años) o a otro brazo en el que los pacientes eran seguidos según la pauta habitual de cada centro (cabe destacar que en algunos centros la pauta habitual incluía también el estudio de PSA y el examen digital rectal). Tras un seguimiento medio de 7 a 10 años, el estudio concluyó que las tasas de mortalidad CaP específica de los dos grupos no diferían significativamente entre sí (Andriole, et al. 2009).

Por otro lado, el estudio ERSPC (*European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer*), se realizó en 7 países europeos e incluyó a 182.000 pacientes, de

entre 50 y 74 años, que se randomizaron aleatoriamente a un brazo control, en el que no eran sometidos a cribado, o a un brazo de cribado con PSA. Tras una media de 9 años de seguimiento la incidencia de CaP en el brazo de cribado fue del 8,2% y la del brazo control del 4,8%. El riesgo relativo de muerte por CaP en el grupo en el brazo de cribado en comparación con el del grupo control fue de 0,80 y la diferencia en el riesgo absoluto de 0,71 muertes por cada 1.000 pacientes. Esto significa que hay que aplicar el cribado con PSA a 1.410 pacientes y tratar a 48 casos adicionales de CaP para prevenir una muerte por CaP. El estudio aportó conclusiones más favorables al cribado con PSA, demostrando una reducción del 20% en la tasa de mortalidad por CaP, aunque también reconoció un alto riesgo de sobrediagnóstico asociado (Andriole, et al. 2009). No obstante, los investigadores de la rama española del estudio ERSPC publicaron sus resultados, basados en el seguimiento de 4.278 pacientes durante 15 años, en los que no se reproducían los del estudio principal. No observaron diferencias en la mortalidad global o cáncer específica, reportaron una tasa de mortalidad por CaP inferior al 1% y concluyeron que el cribado con PSA tenía un escaso rendimiento en nuestro país (Lujan, et al. 2014; Lujan, et al. 2012).

Otro estudio de 2009 que analizaba los resultados observados tras veinte años de cribado en CaP aportaba tres observaciones: (i) que la incidencia de CaP había aumentado tras la implementación del cribado, (ii) que se detectaba una elevada proporción de CaP en estadíos iniciales, y (iii) que el aumento en el número de casos no se traducía en una reducción del número de muertes CaP específicas. Los autores aconsejan buscar e implementar nuevas aproximaciones al cribado,

detección temprana y prevención del CaP para mejorar su eficacia (Esserman, et al. 2009).

Ese mismo año, un artículo en *The New England Journal of Medicine* analizaba la controversia sobre los resultados del cribado con PSA. Describía que el 49% de los hombres americanos mayores de 50 años habían sido sometidos al análisis del PSA al menos una vez. El porcentaje aumentaba hasta el 95% en el caso de los urólogos y al 78% en médicos de asistencia primaria. Reportaba una disminución anual del 4% en las muertes CaP específicas desde el año 1992 (cinco años después de la implementación del estudio de PSA para el cribado de CaP). También analizaba los estudios ERSPC y PLCO destacando sus puntos débiles. En el caso del estudio ERSPC criticaba las diferencias en los criterios de selección de pacientes, esquemas de randomización y estrategias de cribado y seguimiento en los diferentes países participantes. La posible existencia de contaminación del grupo control por pacientes que recibían cribado ya que no se describía con detalle la práctica habitual de cada centro. Finalmente planteaba la dificultad de atribuir el beneficio observado en el grupo de cribado exclusivamente a esta práctica o a un posible mejor tratamiento de los pacientes. En el caso del estudio PLCO atribuía la falta de beneficio del cribado a la contaminación del grupo control por pacientes estudiados antes de entrar al ensayo y por análisis de PSA en el quinto año de seguimiento (Barry 2009).

En 2011 otro artículo que analizaba el cribado de CaP reportaba que, tras la introducción del análisis del PSA, la probabilidad de recibir un diagnóstico de CaP se había doblado entre los años 1985 y 2007, siendo del 9% y el 16%

respectivamente. No obstante, la gran mayoría de los pacientes con CaP morían por otras causas (Hoffman 2011).

Sandblom G et al, reportaron que, tras un seguimiento de 20 años, el porcentaje de muertes atribuibles al CaP no variaba entre los pacientes sometidos a cribado y los del grupo control (Sandblom, et al. 2011).

Otros autores planteaban, en un artículo de 2011, la problemática que se derivaba de las recomendaciones de la USPSTF en la práctica clínica. Reportaron que según el estudio ERSPC se debían invertir 5,2 millones de dólares en el cribado de CaP para prevenir la muerte de un paciente por esta causa (Brett and Ablin 2011).

En 2012 la Agencia Norteamericana de Medicina Preventiva (*United States Preventive Services Task Force*) analizando todos los datos disponibles sobre cribado de CaP, publicó una recomendación de grado D en la que desaconsejaba el cribado de CaP con PSA (Moyer and Force 2012), reavivando las reflexiones y discusiones en múltiples artículos posteriores. En su respuesta, los autores del estudio ERSPC cuestionaron la validez de las conclusiones de la agencia estadounidense, enumerando una serie de déficits metodológicos en el análisis e interpretación de los datos, así como en el sistema sanitario estadounidense (Carlsson, et al. 2012). En cambio, proponían un uso prudente del cribado, evitando su aplicación a la parte de la población con esperanza de vida reducida en la que los beneficios que podía ofrecer eran muy limitados.

En 2012 se publicó una actualización del estudio *ERSPC* que reportaba la mortalidad CaP específica añadiendo 2 años más de seguimiento a los resultados

publicados previamente. Reportaron, tras una media de seguimiento de 11 años, la consolidación de sus resultados anteriores observando una reducción en la mortalidad por CaP en el grupo sometido a cribado (Schroder, et al. 2012).

Wilt TJ et al., publicaron en 2012 los resultados de un estudio que comparaba la mortalidad CaP específica entre dos grupos de pacientes diagnosticados mediante el cribado con PSA. Los del primer grupo fueron sometidos a prostatectomía radical mientras que los del segundo grupo se siguieron mediante vigilancia activa. Tras 12 años de seguimiento, no observaron diferencias significativas en la mortalidad CaP específica entre los dos grupos (Wilt, et al. 2012).

La ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) adopta una postura intermedia en esta discusión, desaconsejando el uso del cribado en hombres con menos de 10 años de esperanza de vida y recomendándolo para los demás (Basch, et al. 2012).

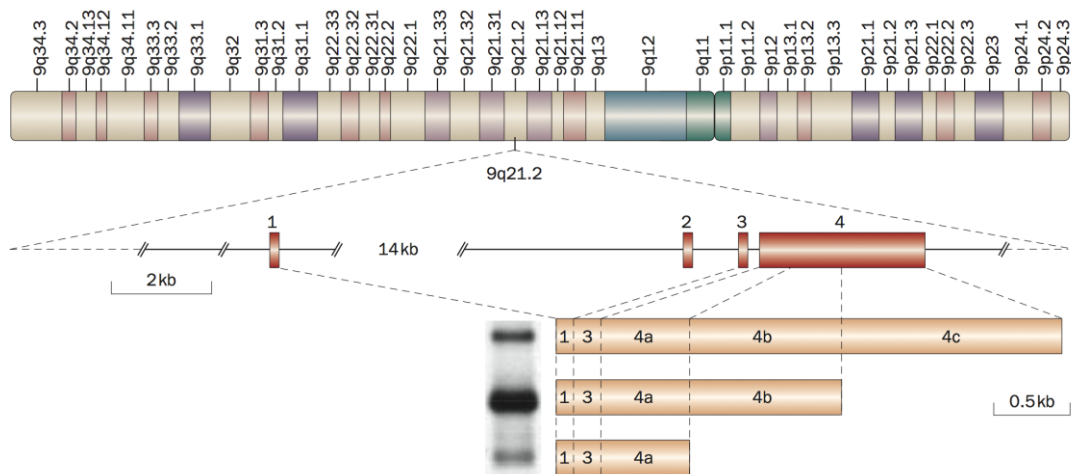
Finalmente, en 2013, la ESMO (*European Society of Medical Oncology*) y la AUA (*American Urological Association*) aportaron su opinión, desaconsejando el cribado con PSA en la población general y recomendándolo sólo en pacientes entre los 55 y los 69 años de edad. Además, en todo momento, insisten en la necesidad de que el médico informe adecuadamente al paciente sobre los riesgos y beneficios del cribado (Carter, et al. 2013; Horwich, et al. 2013).

Esta discusión en la comunidad científica refleja la necesidad de replantear los protocolos actuales de cribado, diagnóstico y tratamiento de CaP y, por otra parte, profundizar en la búsqueda de nuevos biomarcadores específicos y predictivos de CaP. En los últimos años, diversos estudios han explorado y propuesto múltiples

candidatos complementarios al PSA o alternativos, como los genes *PCA3*, *TMPRSS2*, *GSTP1*, *AMACR* y *ERG*. El gen *PCA3* es uno de los más estudiados y se encuentra ya en sus primeras fases de aplicación clínica. (Fernandez-Serra, et al. 2011; Ploussard and de la Taille 2010; Ribeiro da Silva, et al. 2012).

### 3.5 EL GEN *PCA3*

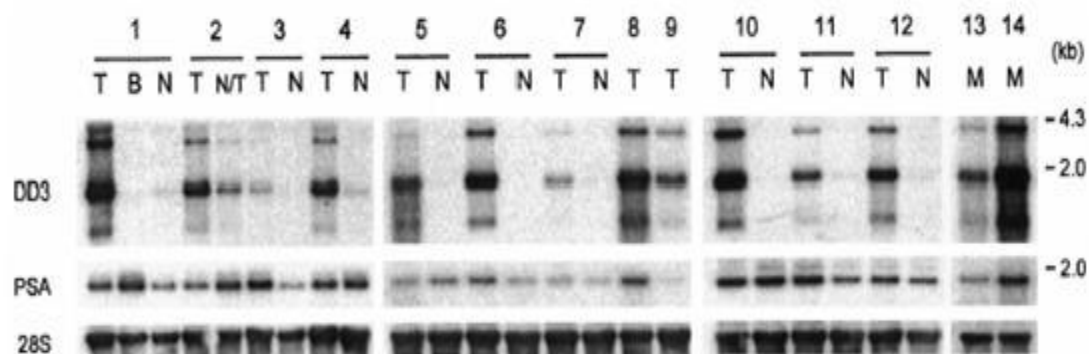
El gen *PCA3* (Prostate Cancer Antigen 3) se encuentra localizado en el cromosoma 9q21.2, orientado en sentido *antisense*, y formado por cuatro exones (Verhaegh, et al. 2000) (Figura 20).



**Figura 20:** Estructura de la unidad de transcripción del *PCA3*. El exón 4 puede someterse a poliadenilación alternativa en tres posiciones diferentes (4a, 4b, y 4c) y por tanto dar lugar a tres transcritos de diferentes tamaños. En el 95% de los casos, el exón 2 se omite mediante splicing alternativo (Hessels and Schalken 2009).

Se transcribe, exclusivamente en tejido prostático, en un ARN mensajero (ARNm) no codificante cuya función no se conoce con exactitud en la actualidad. Un estudio de 2012, realizado sobre modelos *in-vitro*, le otorga un papel modulador en la transcripción de genes diana de la vía del gen AR. Demuestran que el PCA3 controla el crecimiento y la viabilidad de las células prostáticas tumorales sin poder llegar a establecer su mecanismo de actuación (Ferreira, et al. 2012).

El transcrito más común contiene los exones 1, 3, 4a y 4b. *PCA3* se sobreexpresa intensamente en el 95% de los tejidos prostáticos malignos en comparación con los benignos o normales adyacentes (Bussemakers, et al. 1999) (Figura 21).



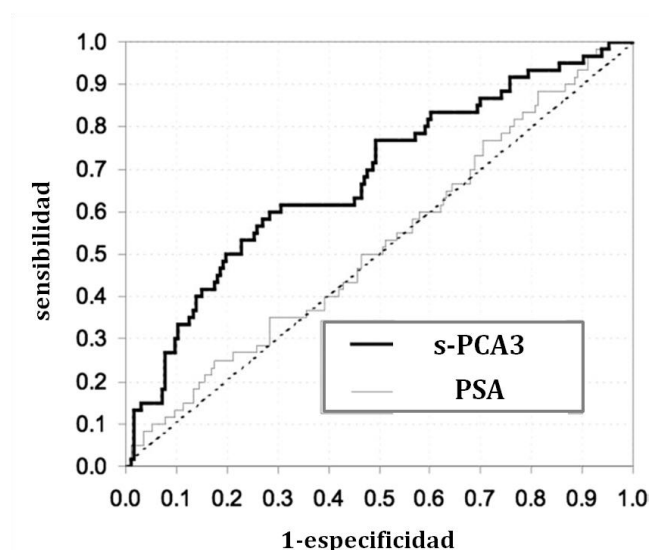
**Figura 21: Patrones de expresión de ARNm de los genes PCA3 y PSA de tejido prostático mediante Northern Blot. T=tejido tumoral, B=Hiperplasia Prostática Benigna, N= tejido normal, M= metástasis (Bussemakers, et al. 1999).**

A diferencia del PSA, la sobreexpresión de *PCA3* es específica de CaP e independiente del volumen prostático y de la presencia de HBP (Hessels and Schalken 2009). En concreto, la supra-regulación del gen *PCA3* en tejido maligno es 66 veces más alta (valor mediano) que en tejido normal. Esta supra-regulación se

manifiesta incluso en tejidos que contienen tan solo un 10% de células cancerosas o menos. Esta observación de que un número tan pequeño de células malignas pueda ser detectado por una PCR de rutina gracias a la sobreexpresión del *PCA3*, propició el desarrollo de un ensayo de detección de *PCA3* ARNm en orina. Desde el año 2006, se comercializa un kit diagnóstico de aplicación clínica para la detección de los niveles de ARNm del gen *PCA3* en muestras de orina recogidas tras masaje prostático, con el que se obtiene un *score* de *PCA3* (s-*PCA3*) (Groskopf, et al. 2006). La prueba es de fácil implementación tanto en el protocolo clínico como en el laboratorio.

Desde los primeros estudios efectuados se puso de manifiesto una relación directamente proporcional entre el s-*PCA3* y el porcentaje de biopsias positivas posteriores (Hessels and Schalken 2009; Rubio-Briones, et al. 2011). En alguno de los estudios más recientes se ha identificado también una relación entre el s-*PCA3* y diferentes determinantes de agresividad tumoral como el grado de Gleason, el volumen de tumor y la invasión extracapsular (Day, et al. 2011; Hessels and Schalken 2009; van Poppel, et al. 2012). Además, un metaanálisis publicado en 2010, atribuye al *PCA3* un valor predictivo negativo del 87,8-98%, reconociendo unos índices de validez diagnóstica aceptables para su uso en el diagnóstico de CaP (Ruiz-Aragón and Márquez-Peláez 2010). La Asociación Europea de Urología en sus guías de 2010 contempla el uso de biomarcadores complementarios al PSA, entre los que destaca el *PCA3* por su mayor especificidad (Heidenreich, et al. 2010; Lee, et al. 2011).

Estudios comparativos más recientes se han dirigido a determinar si la medición del s-PCA3 podría ahorrar biopsias innecesarias en pacientes con valores de PSA alterados sin perjuicio clínicamente significativo de la tasa de detección de CaP (Aubin, et al. 2010; Crawford, et al. 2012; Rubio-Briones, et al. 2014; Rubio-Briones, et al. 2011; Tombal, et al. 2013; Vinet, et al. 2013). En concreto, se ha observado que una nota de corte de s-PCA3 > 30 consigue un 30% de biopsias positivas (Ploussard, et al. 2010). De acuerdo con el conocimiento actual (Day, et al. 2011), otros autores consiguieron un equilibrio óptimo entre sensibilidad y especificidad utilizando una nota de corte de s-PCA3 de 35 (Roobol, et al. 2010). Sin embargo, al usar esta nota de corte como herramienta de primera detección, se perdía el 39% de los CaP y el 26.3% de los tumores de alto grado (Gleason  $\geq$  7). Algunos estudios recientes sugieren que una nota de corte de 25 es más apropiada (Auprich, et al. 2011; de la Taille, et al. 2011; Ploussard, et al. 2011).



**Figura 22: Análisis ROC (*Receiver Operating Characteristic*) basado en el s-PCA3 y los niveles plasmáticos del PSA como índices diagnósticos del CaP. La línea del s-PCA3 se encuentra más alejada del modelo nulo (Marks, et al. 2007).**

A pesar de sus diferencias en el número de cilindros obtenidos en la biopsia, los estudios anteriormente mencionados coinciden en que el *PCA3* tiene mayor especificidad comparado con los niveles plasmáticos de PSA y el índice PSA (Figura 22).

En resumen, el análisis del *PCA3* en orina puede representar una nueva herramienta complementaria para incrementar la precisión en el diagnóstico clínico de CaP.

## **4 OBJETIVOS**



## 4.1 OBJETIVOS

En el presente trabajo se analiza el impacto de la introducción del análisis de expresión del gen *PCA3* en el manejo clínico de pacientes con PSA alterado, con especial atención en la reducción de la indicación de biopsias prostáticas y en su presunta capacidad predictiva de agresividad tumoral en pacientes ya diagnosticados de CaP.

Los objetivos pueden sintetizarse como sigue:

- Estudiar la utilidad del estudio del gen *PCA3* en el manejo clínico de pacientes con sospecha de CaP.
- Evaluar si el estudio del gen *PCA3* puede aportar soluciones a la problemática que genera el cribado del cáncer de próstata con los recursos bioquímicos clásicos, de especificidad y eficiencia cuestionadas.
- Analizar la capacidad del s-*PCA3* para reducir el número de biopsias indicadas, en la práctica clínica, respecto a la indicación basada únicamente en criterios clásicos como el PSA sérico y el tacto rectal.
- Estudiar si el porcentaje de biopsias con diagnóstico de CaP aumenta en pacientes con un s-*PCA3* positivo previo, respecto al que se obtiene en pacientes sin estudio de *PCA3*.
- Explorar la posible relación entre el nivel de expresión del gen *PCA3* en orina post-masaje prostático y la probabilidad de identificar CaP en la biopsia prostática.

- Estudiar la relación del s-PCA3 con distintos parámetros clínico-patológicos de interés, comúnmente evaluados (edad, PSA, índice de PSA, volumen prostático, presencia de prostatitis, presencia de hiperplasia prostática benigna, grado de Gleason , porcentaje de cilindros afectados por carcinoma en la biopsia y porcentaje de tejido afectado respecto al volumen total de tejido biopsiado, medidos en mm. de longitud).
- Explorar la relación del s-PCA3 con los parámetros clásicos de agresividad (volumen tumoral y grado de Gleason) para establecer su utilidad en la predicción del pronóstico antes de efectuar la biopsia.

## **5 PACIENTES Y MÉTODOS**



## 5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Para cumplir los objetivos de este trabajo, se realizó un estudio observacional, prospectivo y multicéntrico con determinación del s-PCA3 en pacientes con sospecha de CaP candidatos a biopsia de próstata. El trabajo se realizó en el contexto del Hospital de Barcelona y el grupo de Assistència Sanitària. En la fase clínica participaron un total de 35 urólogos que, en sus consultas, efectuaron la exploración, la obtención de la muestra según el protocolo específico que se detalla más adelante y el seguimiento clínico del paciente. La mayoría de los pacientes (79,3%) se concentraron en un grupo de 3 urólogos. Las biopsias prostáticas indicadas se realizaron de forma centralizada en los quirófanos del Hospital de Barcelona y siguiendo el protocolo que describimos posteriormente. El estudio histopatológico y el estudio molecular de PCA3 también se centralizaron en el laboratorio de patología molecular del Hospital de Barcelona (Biopat). Para el diseño y autorización del estudio se efectuaron las consultas y gestiones pertinentes con especialistas en urología, patología, oncología y epidemiología, así como con el equipo directivo y comité de ética del centro. Tras la determinación del s-PCA3, se recomendó la realización de una biopsia a aquellos pacientes con un score positivo ( $\geq 35$ ).

## 5.2 PACIENTES

Se incluyeron en el estudio 598 pacientes consecutivos, con una edad media de  $65,5 \pm 8$  años, que acudieron a la consulta del urólogo entre octubre de 2009 y noviembre de 2012, y que cumplían alguno de los siguientes criterios de inclusión:

- PSA alterado inferior a 10 ng/ml sin biopsia previa
- PSA alterado y biopsia previa negativa
- PSA alterado y patología benigna conocida (prostatitis o HPB)
- PSA alterado y alguna comorbilidad que contraindicase la realización de una biopsia

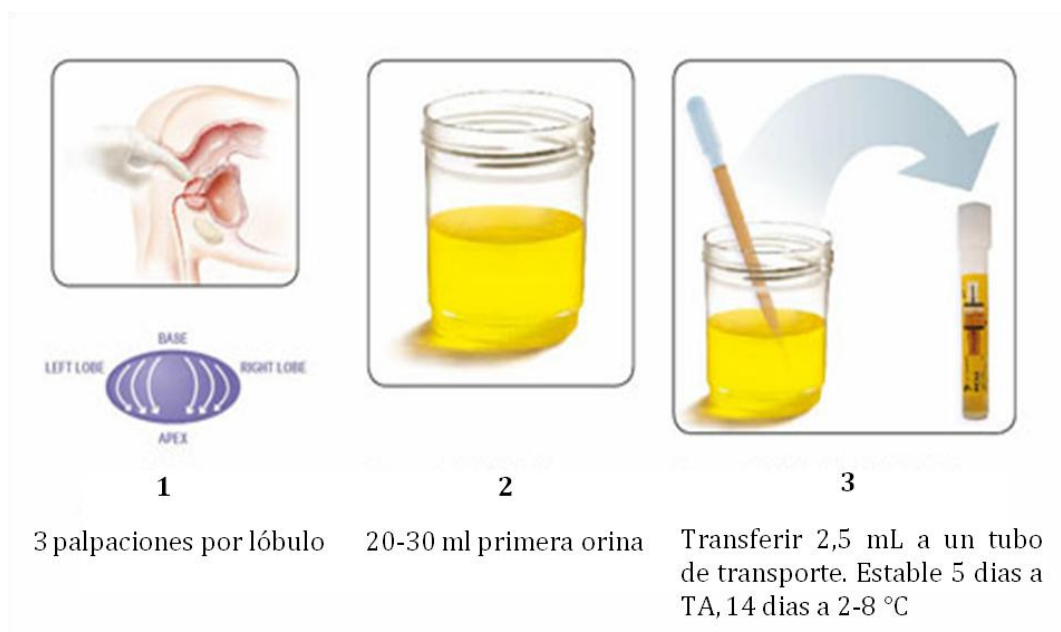
Aquellos pacientes con un diagnóstico previo de CaP fueron excluidos.

Se registraron la edad, el valor de PSA total (ng/ml), el Índice de PSA (%), el volumen prostático (cc) y el resultado del tacto rectal de los pacientes incluidos (normal o sospechoso). En el **Anexo 1** se adjunta la Hoja de Solicitud de Estudio entregada a los urólogos donde éstos completan la información clínica requerida. Cuando un paciente cumplía los criterios necesarios para ser sometido a una biopsia prostática, la decisión final de indicarla la tomó siempre el urólogo considerando en cada caso el contexto clínico.

### 5.3 RECOGIDA DE MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DE S-PCA3

La recogida de muestras de orina se realizó siguiendo este esquema (Figura 23):

1. Se recomendó que el paciente bebiera una cantidad abundante de agua (500 mL) antes de acudir a la visita del urólogo para asegurar que la recolección de orina fuese suficiente.
2. El urólogo realizó un examen digital rectal consistente en tres palpaciones por lóbulo. El tacto rectal resulta en la liberación de las células de la próstata al tracto urinario a través de su sistema de conductos.



**Figura 23: Esquema de la recogida de muestra de orina para la determinación de s-PCA3 ([www.gen-probe.es](http://www.gen-probe.es)).**

Se recogió la primera orina emitida tras el tacto rectal e inmediatamente se transfirió 1 mL a un tubo con medio de transporte capaz de disolver las células y estabilizar el ARNm presente (Figura 23). Cuando las muestras llegaron al

laboratorio se conservaron en un congelador a -30 grados centígrados. Las muestras se procesaron en tandas de 15 para optimizar costes.

#### 5.4 DETERMINACIÓN E INTERPRETACIÓN DEL *SCORE* DE *PCA3*

La determinación del s-*PCA3* se realizó con el kit comercial PROGENSA™ *PCA3* (Gen-Probe). El ensayo se compone de dos pruebas cuantitativas de amplificación de ácidos nucleicos y combina tres tecnologías para simplificar el procesado de los especímenes de orina, amplificar el ARNm objetivo y detectar el amplicón respectivamente:

- Captura del objetivo: esta técnica permite aislar las moléculas de ARNm objetivo de los especímenes de orina. El medio de transporte que conserva la orina contiene dos oligonucleótidos de captura específicos para el ARNm de *PCA3* y de PSA. Se procesan un total de cuatro tubos por muestra, dos en los que se aíslan las moléculas de ARNm de *PCA3* y dos en los que se aíslan las moléculas de ARNm de PSA. Esto se consigue poniendo en contacto las muestras de orina con un buffer específico para cada molécula de ARNm, éste contiene micropartículas magnéticas con secuencias de ARNm complementarias al oligonucleótido de captura (Figura 24). Al aplicar un campo magnético y realizar lavados se consigue eliminar los componentes exógenos del tubo de reacción. Esta técnica simplifica el procesado de la muestra y permite trabajar con volúmenes grandes de la misma. Asimismo, elimina los inhibidores presentes en la muestra y la prepara para la amplificación.

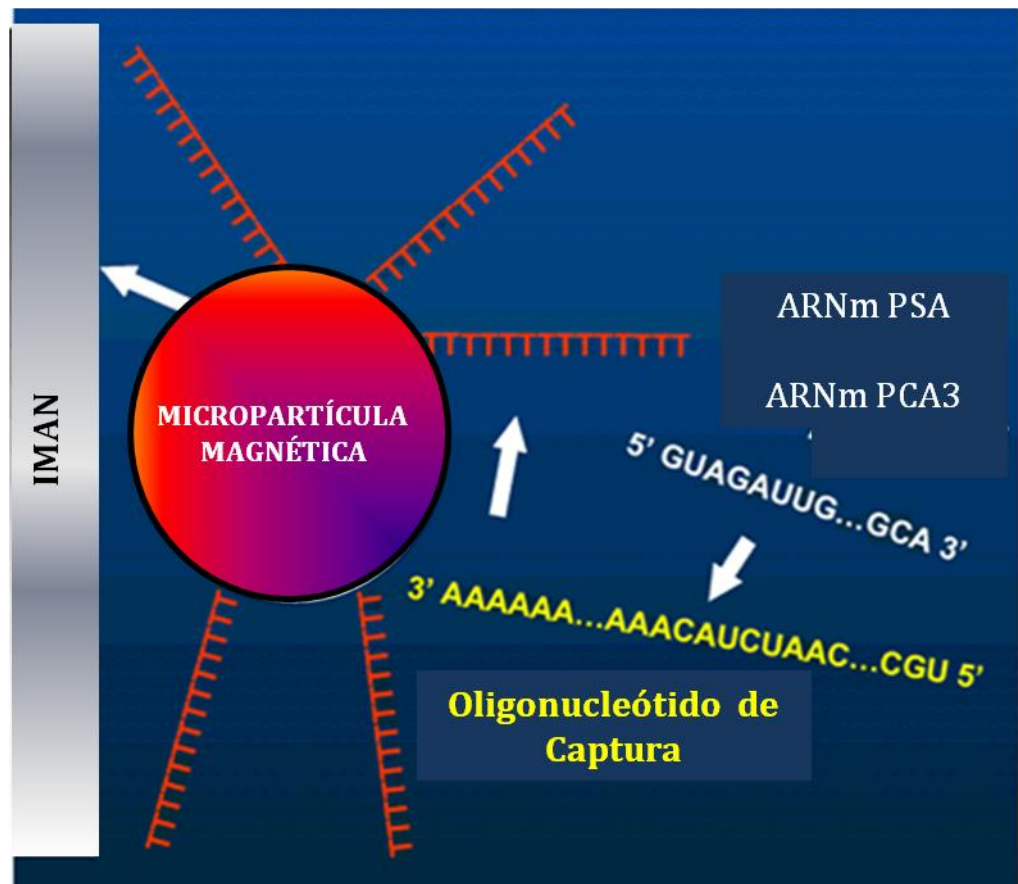


Figura 24: Representación de una micropartícula magnética y las secuencias de ARNm de captura (modificada de [www.gen-probe.es](http://www.gen-probe.es)).

- Amplificación mediada por transcripción (TMA): esta técnica permite la amplificación selectiva de las moléculas de ARNm objetivo. Es una técnica más eficiente que la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional ya que se realiza a una temperatura constante de 60°C. La reacción dura aproximadamente una hora y es altamente eficiente ya que permite la obtención de diez billones de copias de las moléculas diana. Utiliza un único par de cebadores para cada objetivo y dos enzimas. La primera en actuar es una Transcriptasa Reversa que crea una doble cadena de ADN complementario (ADNc) a partir del ARNm presente en la muestra. Estas copias de ADNc

contienen una secuencia promotora específica para la segunda enzima que participa en la reacción, la RNA polimerasa T7. Esta enzima utiliza de molde las moléculas de ADNc y las copia en ARNm complementario. Estas nuevas moléculas sirven de molde a la Transcriptasa Reversa permitiendo que el ciclo vuelva a iniciarse (Figura 25).

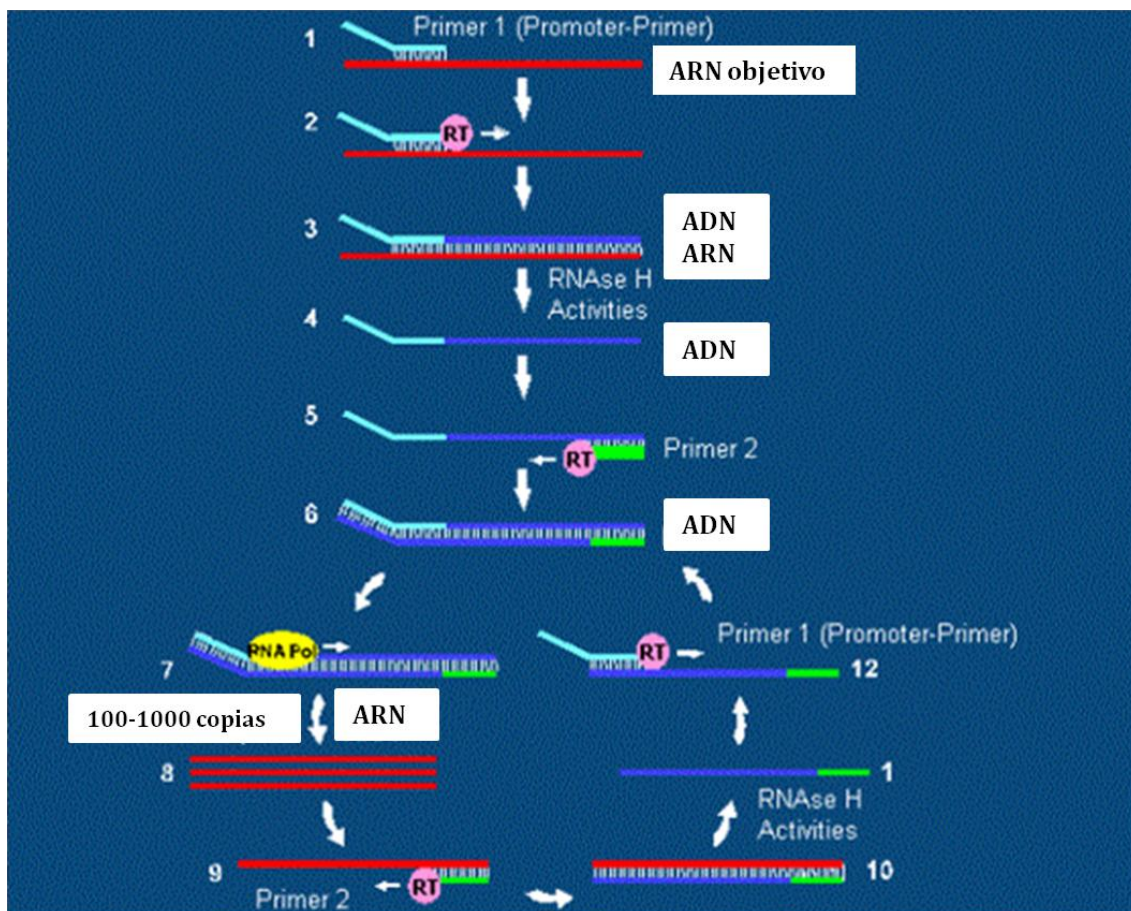
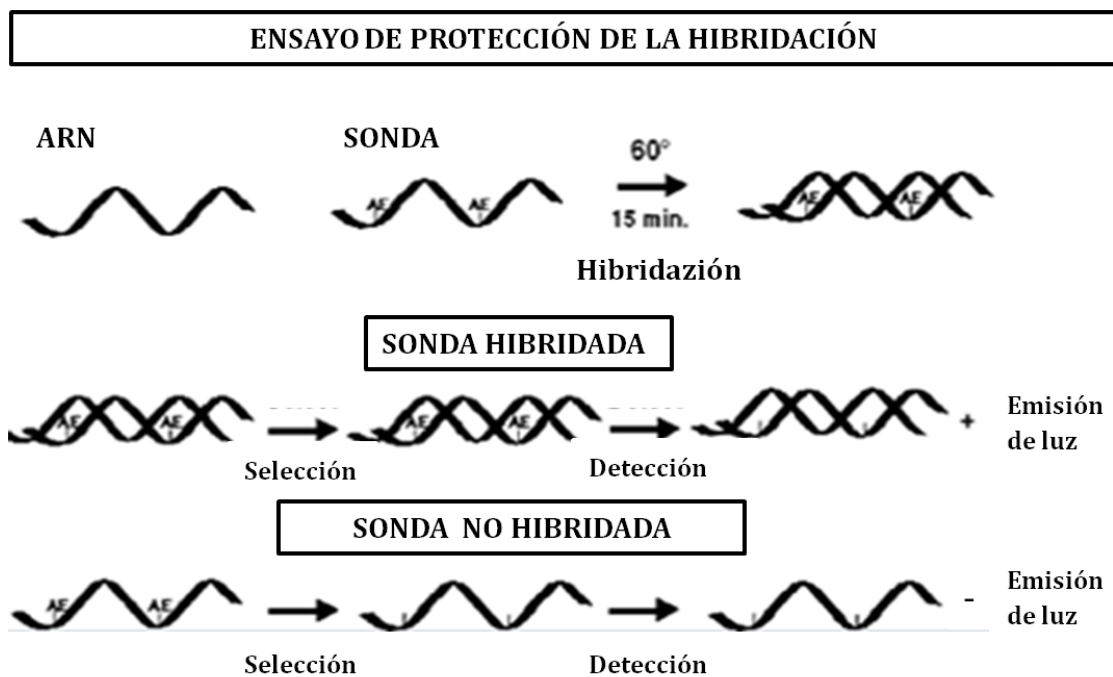


Figura 25: Esquema de la Transcripción Mediada por Transcripción (TMA) ([www.progenesa.es](http://www.progenesa.es)).

- Ensayo de la protección de la Hibridación (Hibridization Protection Assay (HPA)): esta técnica utiliza sondas de ácidos nucleicos de cadena única marcadas con una molécula quimioluminiscente (acridium ester) que son

complementarias al amplicón objetivo (Figura 26). Estas sondas se hibridan específicamente a su amplicón. Al añadir un reactivo de selección se inactivan las sondas no hibridadas. La detección se realiza en un luminómetro que mide la señal quimiluminiscente producida por la sonda hibridada y la reporta en unidades luminosas relativas (RLU).



**Figura 26: Esquema del ensayo de Protección de la Hibridación (HPA) (de [www.progenesa.es](http://www.progenesa.es)).**

Cada muestra se procesa por duplicado y en paralelo con el fin de cuantificar el número de moléculas de ARNm de *PCA3* y de *PSA*. La medición del número de moléculas de ARNm de *PSA* sirve para normalizar la señal de *PCA3* y para confirmar la liberación de RNA específico de células prostáticas suficientes para generar un resultado válido.

En cada ensayo, junto a las muestras, se procesan cinco calibradores por triplicado y dos controles por duplicado. Los calibradores, de concentración de ARNm de *PCA3* y *PSA* conocidas, permiten generar una curva patrón en la que se extrapolarán los resultados de las muestras para determinar la concentración de cada analito y así calcular posteriormente el cociente que da lugar al s-*PCA3*. Los controles para *PCA3* y *PSA* permiten verificar la precisión de los resultados interpolados a partir de la curva estándar.

Los resultados en RLU de las muestras se extrapolan a concentración de mRNA (*PCA3* o *PSA*) y se calcula el s-*PCA3* según la fórmula:

$$\text{s-PCA3} = \frac{\text{Moléculas de ARNm de PCA3}}{\text{Moléculas de ARNm de PSA}} \times 1000$$

Se interpreta como un s-*PCA3* positivo al cociente superior o igual a 35. Los *scores* positivos confieren una alta probabilidad de encontrar CaP en una biopsia prostática posterior, tanto más alta cuanto más alto es el *score* (Groskopf, et al. 2006) (Figura 27). La realización de biopsias prostáticas se recomendó únicamente a aquellos pacientes con s-*PCA3* positivo, dejando a su elección la decisión final de practicarla, con el asesoramiento clínico adecuado.

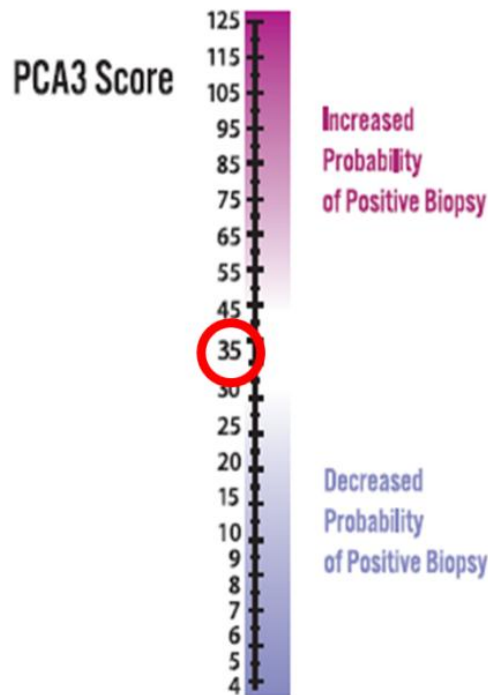
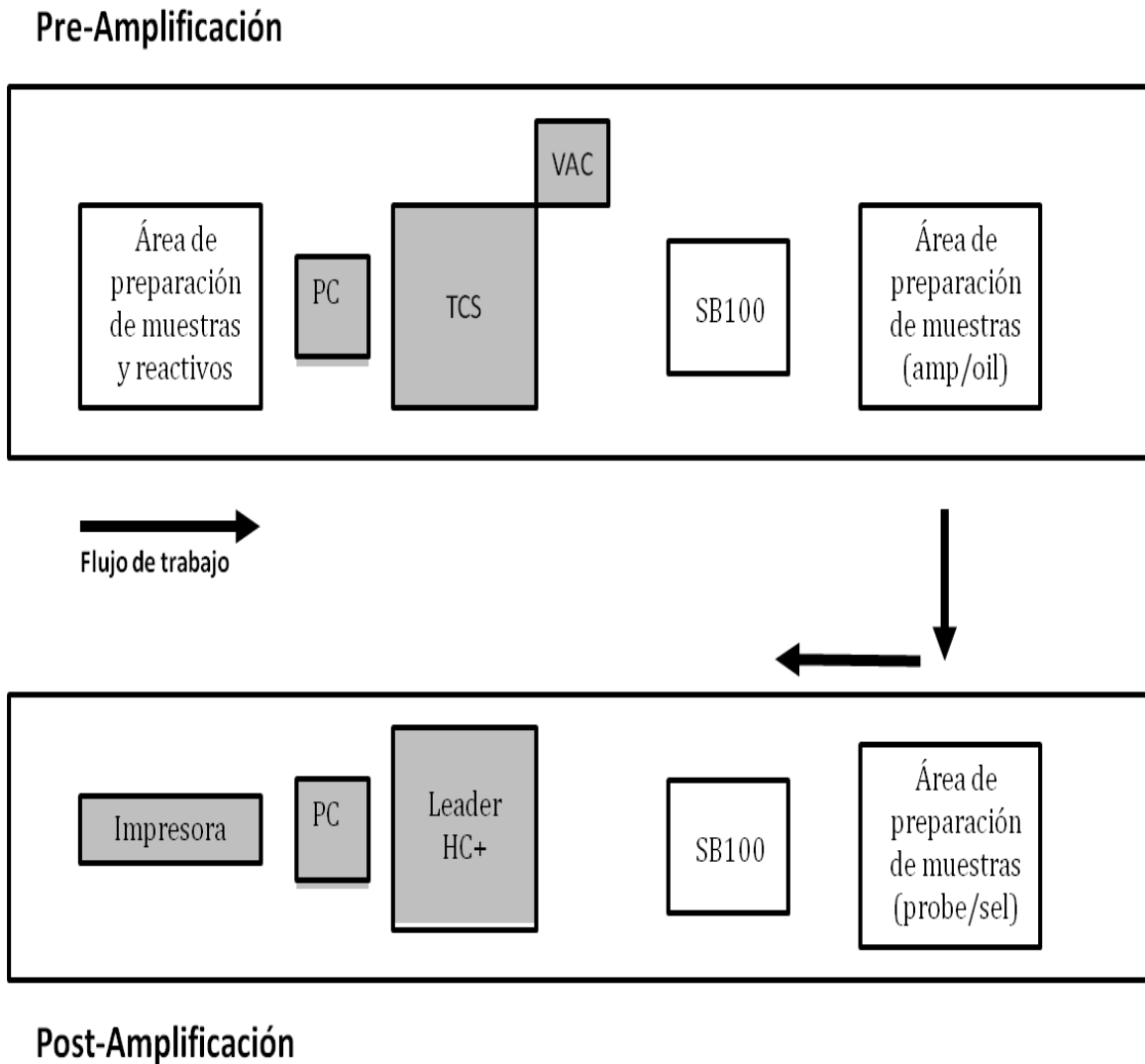


Figura 27: Distribución e interpretación del s-PCA3 (de [www.gen-probe.es](http://www.gen-probe.es)).

***PROTOCOLO DE LABORATORIO PARA LA DETERMINACION DEL s-PCA3 CON EL KIT PROGENSA PCA3 Assay***

El flujo de trabajo en el laboratorio es unidireccional. Se realiza la primera parte de la técnica en la zona de pre-amplificación y la segunda en la zona de post-amplificación. Ambas zonas están separadas físicamente en nuestro laboratorio y cuentan cada una con su propio material de trabajo. Las muestras se procesan únicamente en la zona de pre-amplificación. El ensayo de captura y la Amplificación Mediada por Transcripción se realizan a su vez en esta zona. Una vez terminada la TMA los tubos son llevados, sin abrir, a la zona de post-amplificación donde se sigue con el procedimiento.

La figura 28 esquematiza el proceso y presenta la maquinaria necesaria.



**Figura 28: Flujo de trabajo unidireccional en el laboratorio para la determinación del s-PCA3 con el kit ProgenSA PCA3 Assay (PC: ordenador personal; TCS: *Target Capture System*; VAC: bomba de vacío; SB100: bloque térmico con agitación; Leader HC+: Luminómetro Leader HC+).**

**CAPTURA DEL OBJETIVO**

1. En la zona de pre-amplificación se prepara el ordenador, la estación de captura ( TCS= *Target Capture System*) y la bomba de vacío (Figura 29). Se enciende el SB100 y se carga el programa "Pre-Amp PCA3".

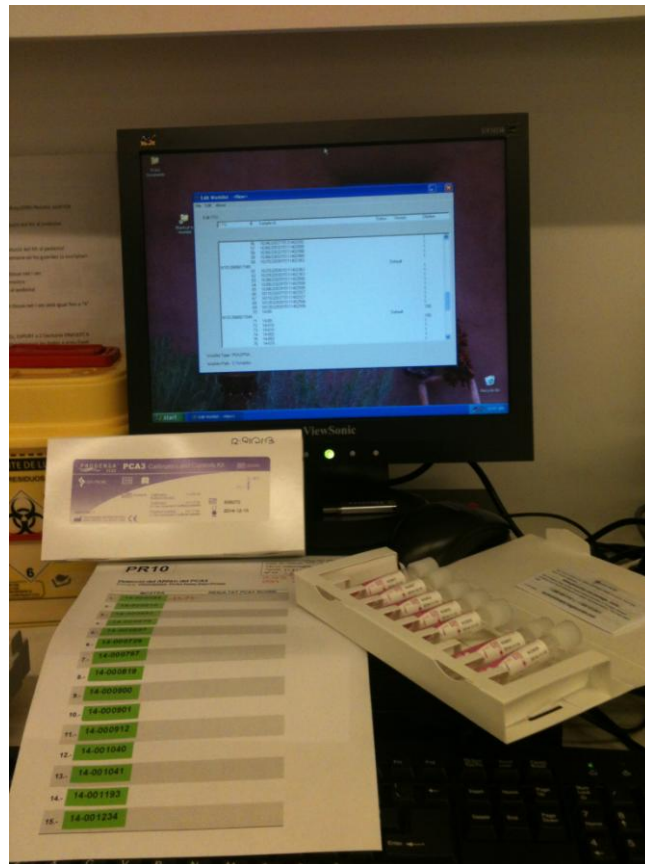


**Figura 29: Fotografía del ordenador, el TCS (en el centro de la imagen) y el SB100 (a la derecha de la imagen) de la zona pre-amplificación de BIOPAT.**

2. Se prepara un área donde dejar los reactivos para que se atemperen y se puedan reconstituir. Se prepara la hoja de trabajo y se descongelan, a temperatura ambiente, 15 muestras (Figura 30).



- h. Del tubo 20 al 49, se rotulan con el número de muestra siguiendo el orden de la Hoja de trabajo. Cada muestra se procesa por duplicado en dos tubos diferentes y consecutivos con los reactivos para PCA3.
5. Las TTUs de la fila 6 a la 10, serán para el análisis de PSA. Se rotulan los tubos de la siguiente manera:
- a. Calibrador PSA 1 – Tubos 51,52,53
  - b. Calibrador PSA 2 – Tubos 54,55,56
  - c. Calibrador PSA 3 – Tubos 57,58,59
  - d. Calibrador PSA 4- Tubos 60,61,62
  - e. Calibrador PSA 5 – Tubos 63,64,65
  - f. Control A de PSA – Tubos 66,67
  - g. Control B de PSA – Tubos 68,69
  - h. Del tubo 70 al 99, se rotulan con el número de muestra siguiendo el orden de la Hoja de trabajo. Cada muestra se procesa por duplicado en dos tubos diferentes y consecutivos con los reactivos para PSA.
6. Con el programa GEN-PROBE Worklist Editor se crea una *worklist*. Se especifica la posición y número de lote de los calibrados y controles, así como las posiciones de las muestras (Figura 31).



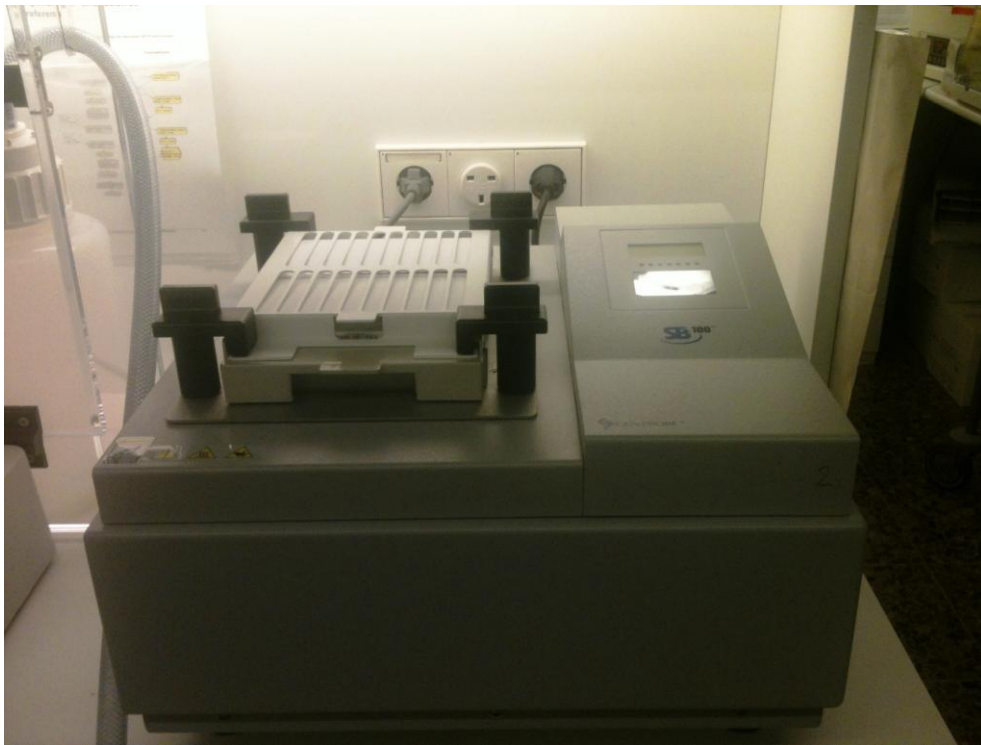
**Figura 31: PROGENSA Worklist Editor, Calibradores y Controles para PCA3 y PSA y Hoja de Trabajo con el registro de muestras que se analizan.**

7. Se dispensa 100 $\mu$ L de Target Capture Reagent (TCR) a cada tubo de reacción.
8. Se añade 400 $\mu$ L de los Calibradores y Controles a cada uno de sus tubos respectivos (Figura 32).



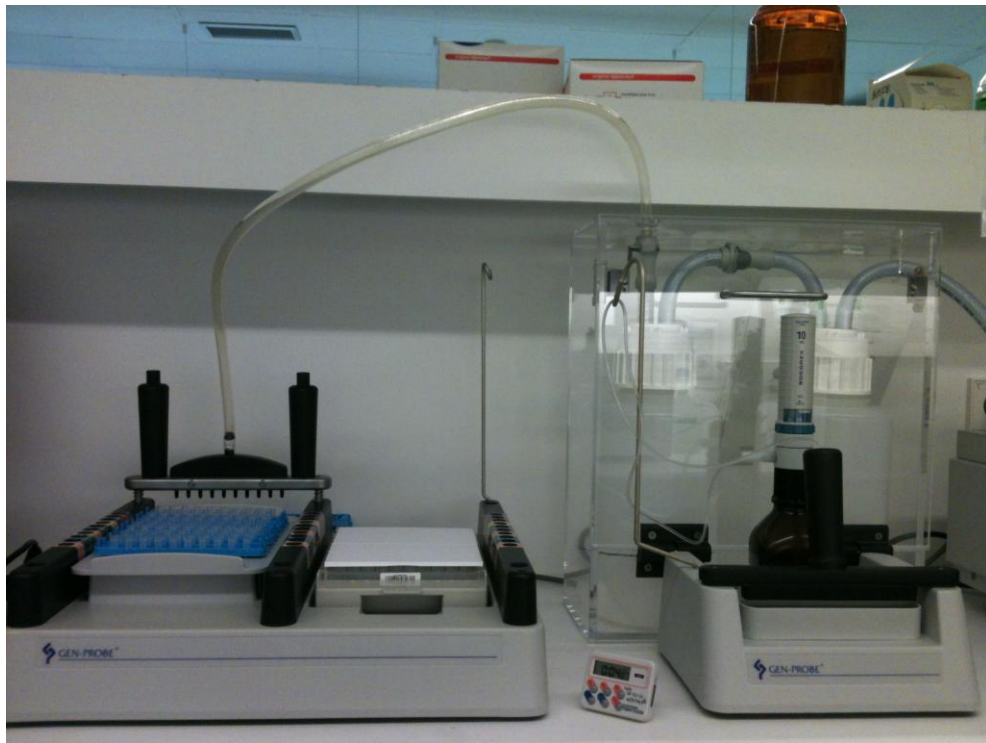
**Figura 32: Rack con los TTUs, Target Capture Reagents, Calibradores y Controles para PCA3 y PSA.**

9. Se añade 400 $\mu$ L de cada muestra a sus tubos respectivos.
10. Se sellan los tubos con dos tarjetas autoadhesivas (una para los 50 tubos con reactivos para PCA3 y otra para los 50 tubos con reactivos para PSA).
11. Se coloca el rack en el SB100 (Figura 33). Se realiza un vortex a 1.000 rpm durante 10 segundos y mantiene las muestras a 62°C durante 35 minutos. Pasado este tiempo se realiza un vórtex de 1 minuto a 1.800 rpm y disminuye la temperatura de manera gradual y controlada hasta los 23°C. Incuba las muestras a 23°C durante 18 minutos.



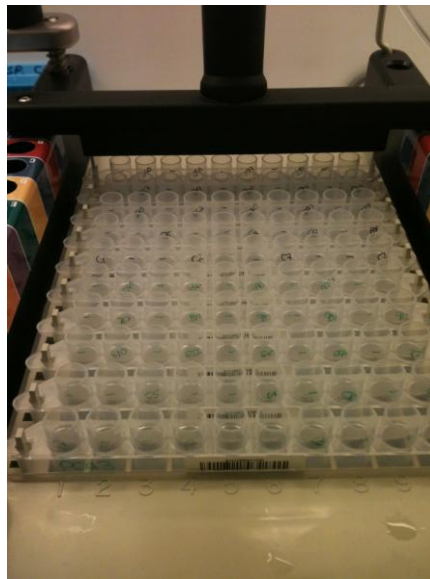
**Figura 33: SB100 con el rack de TTUs.**

12. Se traspasa el rack a la base magnética TCS y se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos (Figura 34).



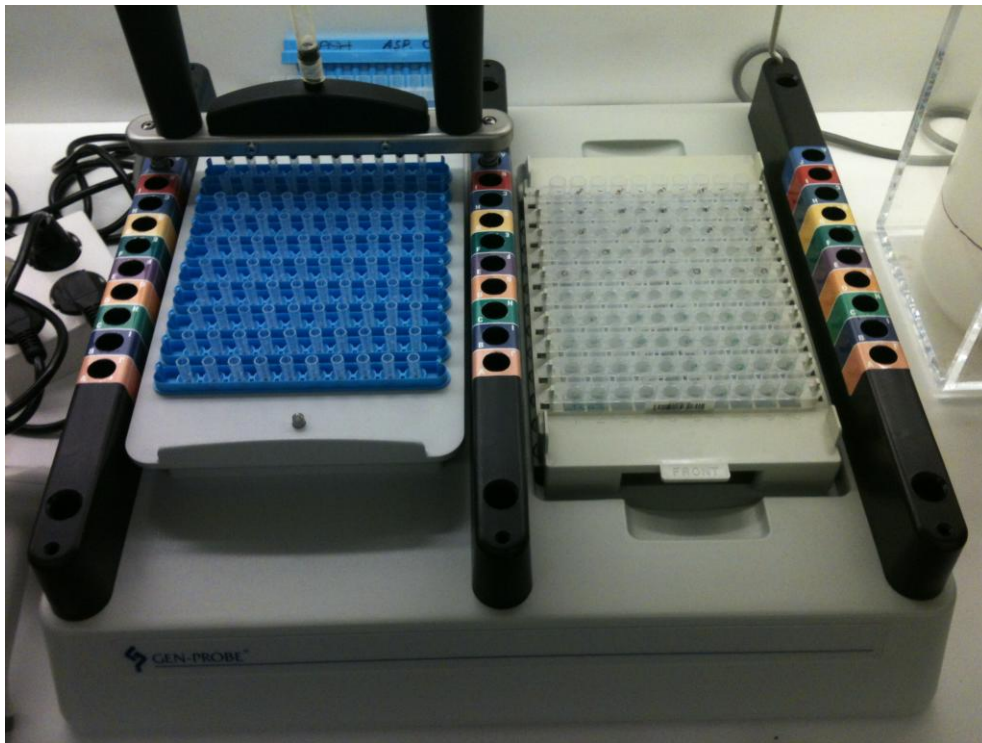
**Figura 34: Base magnética TCS, bomba de vacío y estación de dispensación del tampón de lavado.**

13. Se enciende la bomba de vacío y se aspira el material de todos los tubos.
14. Se añade 1 mL de tampón de lavado (Figura 35).



**Figura 35: Dispensación de 1 mL de tampón de lavado a cada tubo de reacción.**

15. Se sellan los tubos con dos tarjetas autoadhesivas
16. Se coloca el rack en el SB100. Se realiza un vórtex a 1.600 rpm y 23°C durante 10 segundos.
17. Se traspasa el rack a la base magnética TCS y se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos (Figura 36).



**Figura 36: Base magnética TCS con el rack de TTUs.**

18. Se enciende la bomba de vacío y se aspira el material de todos los tubos.

### ***CAPTURA DEL OBJETIVO***

19. Se dispensan 75  $\mu$ L de Amplification Reagent a cada tubo.

20. Se añaden 200  $\mu$ L de Oil Reagent.

21. Se sellan los tubos con dos tarjetas autoadhesivas.

22. Se coloca el rack en el SB100. Se realiza un vórtex a 1.800 rpm y 62°C durante 10 segundos. Se incuba el rack durante 10 minutos a 62°C. Pasado este tiempo disminuye la temperatura de manera gradual y controlada hasta los 42°C. Se incuban las muestras a 42°C durante 30 segundos.

23. Sin sacar el rack del SB100, se dispensan 25  $\mu$ L de Enzime Reagent a cada tubo de reacción (no pueden pasar más de 90 segundos entre la dispensación del enzima del primer al último tubo).

24. Se sellan los tubos con dos tarjetas autoadhesivas.
25. El SB100 realiza un vórtex a 700 rpm y 42°C durante 5 segundos.  
Posteriormente incuba el rack a 42°C durante una hora.
26. Cuando el SB100 termina, se saca el rack y se lleva sin destapar los tubos de reacción a la zona de post-amplificación.

### **HIBRIDIZACIÓN**

En la zona post-amplificación utilizaremos un SB100, un Luminómetro HC+ Leader y un ordenador personal (Figura 37).



**Figura 37: Zona de post-amplificación de BIOPAT con el SB100 (izquierda), el Luminómetro Leader HC+ (centro) y el ordenador (derecha).**

27. Se añaden 200  $\mu$ L de *Probe Reagent* (éste contiene la sonda específica).
28. Se sellan los tubos con dos tarjetas autoadhesivas.

29. Se coloca el rack en el SB100. Se realiza un vórtex a 1.800 rpm y 62°C durante 10 segundos. Se incuba el rack durante 20 minutos a 62°C.
30. Transcurrido este tiempo, se retira el rack de SB100 y se deja sobre la poyata 5 minutos.

### **SELECCIÓN**

31. Se añaden 250 µL de *Selection Reagent* a cada tubo de reacción.
32. Se sellan los tubos con dos tarjetas autoadhesivas.
33. Se coloca el rack en el SB100. Se realiza un vórtex a 1.800 rpm y 62°C durante 10 segundos. Se incuba el rack durante 10 minutos a 62°C. Pasado este tiempo disminuye la temperatura de manera gradual y controlada hasta los 23°C. Se incuban las muestras a 23°C durante 2 minutos y medio.
34. Cuando el SB100 termina, se saca el rack y se cargan las TTUs en el Luminómetro Leader HC+ (Figura 38). Se procede a la lectura con el software PROGENSA PCA3 Assay Software.



**Figura 38: Luminómetro Leader HC+ y software PROGENSA PCA3 Assay Software.**

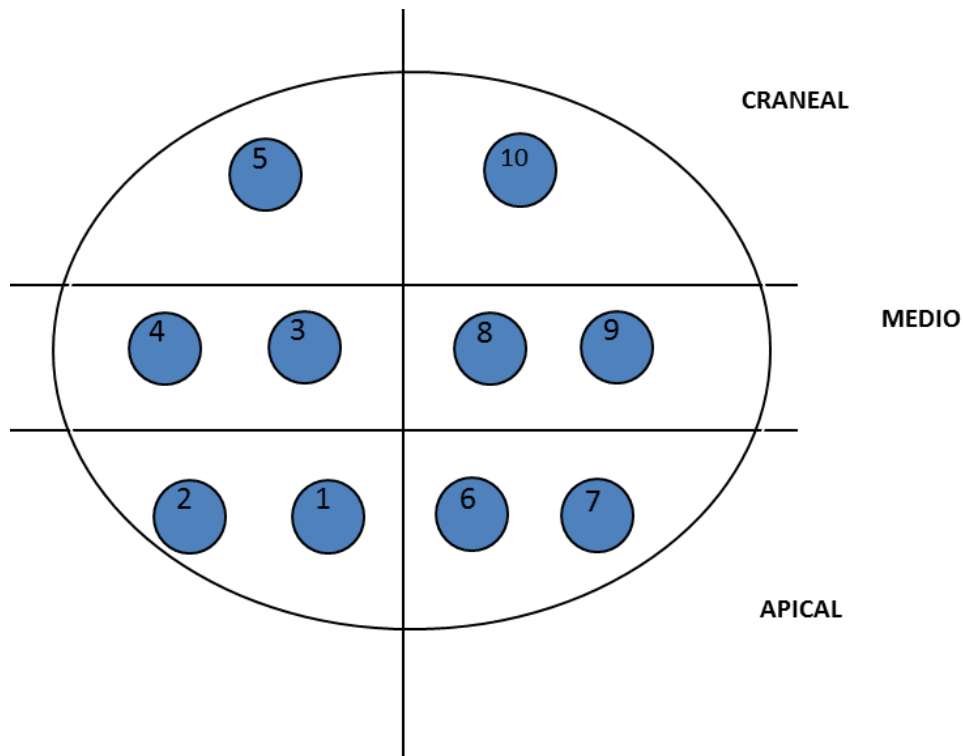
35. Cuando termina la lectura, se ponen los TTUs en *Deactivation Fluid*.

El software ofrece dos informes: (i) un *Raw Run Report* (adjunto en el **Anexo 2**) con las lecturas individuales de cada tubo de reacción en RLU y su valor correspondiente en copias/mL: y (ii) un *Ratio Report* (adjunto en el **Anexo 3**) con los valores finales de copias/mL de RNAm de PCA3 y PSA y el s-PCA3 calculado para cada muestra.

Con estos datos se genera un informe que es enviado al urólogo que solicitó el estudio. En el **Anexo 4** se adjuntan tres ejemplos de Informe, uno con un s-PCA3 positivo, otro negativo y uno de un caso no valorable.

## 5.5 PROTOCOLO DE REALIZACIÓN DE LA BIOPSIA PROSTÁTICA

Las biopsias prostáticas fueron realizadas en quirófano bajo anestesia con sedación, ecoguiadas y por vía transrectal, obteniendo un mínimo de cinco cilindros por lóbulo, con muestras adicionales en el caso de encontrar nódulos sospechosos en el tacto rectal o la ecografía. En aquellos pacientes en los que ya se habían realizado biopsias prostáticas previamente, las siguientes biopsias fueron realizadas por saturación, obteniendo un mínimo de 10 cilindros por lóbulo (Figura 39).



**Figura 39: Representación esquemática de la próstata con mapa de biopsias y localización de los cilindros obtenidos y las claves que se les asigna.**

## 5.6 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Los cilindros de tejido prostático obtenidos en las biopsias fueron fijados en formaldehído tamponado al 10% e incluidos en parafina. Se cortaron secciones de 5 micras que se tiñeron con hematoxilina-eosina y fueron estudiadas por dos patólogos de manera independiente con examen conjunto y conclusiones consensuadas en casos discordantes o complejos, pero especialmente para consensuar el grado de Gleason siempre que fué necesario. En todos los casos de carcinoma, se registró el grado de Gleason, el número de cilindros evaluados, el porcentaje de cilindros afectados por carcinoma, la longitud en milímetros de la totalidad de los cilindros agrupados, de las zonas con carcinoma y el porcentaje de

éstas sobre la totalidad. El estudio se complementó siempre que lo indicó el patólogo con un panel inmunohistoquímico incluyendo racemasa (AMACR) y marcadores de células basales (p63 y citoqueratina 34βE12) para confirmar malignidad.

Las entidades diagnósticas contempladas fueron:

- Carcinoma de próstata (CaP)
- Proliferación microacinar atípica (ASAP).
- PIN de alto grado (HGPIN).
- Prostatitis crónica, hiperplasia benigna (HPB) u otros procesos no neoplásicos.
- Normalidad.

La categoría ASAP se reservó fundamentalmente para proliferaciones microglandulares con criterios morfológicos e inmunohistoquímicos (pérdida de estrato basal y/o expresión de AMACR) de CaP, pero insuficientemente representadas en las biopsias para sustentar un diagnóstico de certeza de CaP.

### ***Protocolo inmunohistoquímico***

Se utilizó un protocolo de inmunohistoquímica basado en el método de avidina-biotina-peroxidasa sobre secciones de 4µm de tejido parafinado. La recuperación antigénica se realizó mediante calor como se detalla a continuación, tras su desparafinación y rehidratación:

- AMACR: recuperación por calor en tampón citrato 0,1 M (pH 6,0), en una olla a presión, durante 3 minutos.

- p63: recuperación por calor en tampón EDTA 0,1 M (pH 8,0) en una olla a presión, durante 2 minutos.
- 34 $\beta$ E12: recuperación por calor en tampón citrato 0,1 M (pH 6,0), en microondas durante 8 minutos. Digestión con proteasa 8 minutos.

El bloqueo de la peroxidasa endógena se consiguió mediante una incubación de las preparaciones en peróxido de hidrógeno al 1% durante 15 minutos. Se incubaron las preparaciones 15 minutos en PBS para unificar los pHs.

Para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo se incubaron las preparaciones en suero normal de caballo 1:20 en 2% de PBS/BSA/AS (tampón fosfato/albumina sérica bovina/ azida sódica) durante 20 minutos.

Se eliminó el suero y se incubaron las preparaciones con su correspondiente anticuerpo primario en 2% de PBS/BSA/AS, a temperatura ambiente durante 60 minutos. La concentración para cada uno de los anticuerpos monoclonales primarios de ratón fue: AMACR (Thermo , clon 13H4 , dilución 1:200) , p63 (Máster Diagnostica , clon 4A4 , dilución 1:800) , 34 $\beta$ E12 (Novocastra , clon 34 $\beta$ E12 , 1:200) .

Se incubaron las preparaciones con el anticuerpo secundario biotinilado (Vector Laboratoies Inc , Burlingame , CA) a una dilución final de 1:100 , en PBS , durante 40 minutos .

Se incubaron las preparaciones con el complejo de avidina-biotina (Vectastain Elite ABC 6100 , Vector Laboratories) a una dilución 1:50 , en PBS , durante 40 minutos.

Se incubaron en una solución de 3,3'- diaminobenzidina sódica en PBS (que actúa como cromógeno).

Finalmente se aplicó una contratinción con hematoxilina de Harris modificada a las preparaciones, se deshidrataron y se montaron con DPX.

Se utilizaron controles positivos y negativos (por omisión del anticuerpo primario) en cada uno de los experimentos.

Se reportó la presencia o ausencia de expresión en las células tumorales, considerándose como positivo cualquier grado de expresión.

## **5.7 ANALISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico tuvo como objetivo principal explorar las posibles relaciones entre las diferentes variables (categóricas y continuas) que fueron recogidas en la parte experimental del estudio (Tabla 1).

**Tabla 1: Relación de las variables clínico patológicas recogidas y estudiadas.**

Variables estudiadas
Edad
PSA
Indice de PSA
Volumen Prostático
Prostatitis
Hiperplasia Prostática Benigna
Número de cilindros de la biopsia
Número de cilindros afectados por tumor
Porcentaje de cilindros afectados por tumor
Milímetros de tejido en la biopsia
Milímetros de tejido afectado por tumor
Porcentaje de milímetros de tejido afectado por tumor
Grado de Gleason

Además de examinar algunos estadísticos descriptivos (media, mediana, desviación estándar, etc.), se ha procedido a inferencias que consistieron en los siguientes análisis:

*Asociación entre variables categóricas*

Las posibles asociaciones entre pares de variables categóricas fueron analizadas con el *test exacto de Fisher* (Fisher, 1922). Se trata de una prueba de significación estadística aplicada a tablas de contingencia. En el caso de dos variables dicotómicas, se produce una tabla 2x2:

		Variable 2		
		1ª clase	2ª clase	
Variable 1	1ª clase	A	b	a+b
	2ª clase	C	d	c+d
		a+c	b+d	n=a+b+c+d

La probabilidad de obtener un conjunto de valores concreto en esta tabla sigue una distribución hipergeométrica y se calcula con la siguiente fórmula (La anotación en paréntesis representa combinatorios):

$$p = \frac{\binom{a+b}{a} \times \binom{c+d}{c}}{\binom{n}{a+c}}$$

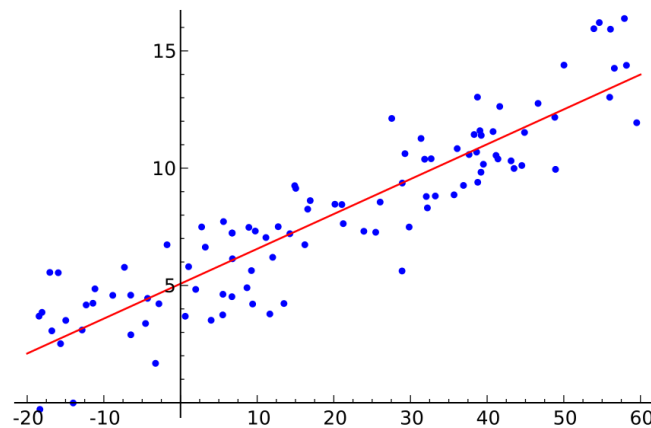
Por defecto, un p-valor < 0.05 se considera significativo. En comparación con la prueba  $\chi^2$ , la ventaja de esta prueba es que se puede emplear incluso cuando los tamaños muestrales son pequeños.

### *Regresión lineal simple*

Cada una de las variables continuas se analizó por separado con un modelo de regresión lineal simple (que admite sólo una variable explicativa). La regresión lineal simple ajusta una línea recta a través de un conjunto de puntos comprendidos por los valores de una variable explicativa (x) y una variable de respuesta (y). La ecuación de la línea es la siguiente:

$$y = ax + b$$

A través de la técnica de *mínimos cuadrados*, se estiman los valores a y b de tal manera que las distancias verticales entre los puntos del conjunto de datos y la línea ajustada sea lo más pequeña posible (Figura 40). En el análisis de regresión lineal simple, el valor (a) se interpreta como la correlación entre la variable explicativa y la variable de respuesta.



**Figura 40: Ejemplo de regresión lineal simple.**

### *Regresión de Spearman*

Además de la regresión lineal simple, también se ha calculado el coeficiente de correlación de Spearman  $\rho$ . Este estadístico no paramétrico mide la correlación entre dos variables continuas sin el requisito que se ajusten a una distribución normal. Para calcular  $\rho$ , los datos se ordenan y se reemplazan por su respectivo orden, y se aplica la siguiente fórmula:

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum D^2}{N(N^2 - 1)}$$

donde D es la diferencia entre los correspondientes estadísticos de orden de x - y, y N es el número total de pares de valores.

### *Análisis log-lineal*

Finalmente, para determinar la relación entre ternas de variables categóricas, se llevó a cabo un análisis log-lineal. El análisis log-lineal es una técnica que examina la relación entre más de dos variables categóricas y sus interacciones. Según este análisis, los diferentes modelos (en nuestro caso diferentes combinaciones de tres variables categóricas) se ponen a prueba para encontrar el más parsimonioso (es decir, el menos complejo) que mejor explica la variación en las frecuencias observadas. El análisis log-lineal utiliza un estadístico  $X^2$  de ratios de verosimilitud:

$$X^2 = 2 \sum O_{ij} \ln \frac{O_{ij}}{E_{ij}},$$

Donde  $O_{ij}$  representa frecuencias observadas y  $E_{ij}$  representa frecuencias esperadas. El estadístico sigue una distribución  $\chi^2$  aproximada cuando el tamaño muestral es grande.

En nuestro caso, se buscó el mejor modelo mediante un algoritmo *stepwise* (que generalmente va añadiendo o quitando una variable en cada paso del análisis) y el criterio de información de Akaike (AIC) que busca una compensación entre lo bien que se ajusta un modelo (*goodness-of-fit*) y su respectiva complejidad. El algoritmo *stepwise* en los análisis presentados en esta tesis partía del modelo completo (saturado), es decir, con todas las variables posibles y las interacciones entre ellas (Friendly).

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el paquete estadístico R v.2.15.1(RDevelopment).

En los casos en que un paciente tenía múltiples determinaciones de s-PCA3 sólo se consideraron los datos de la última muestra recibida.



## **6 RESULTADOS**



## 6.1 DESCRIPCIÓN DE LA SERIE

En el estudio se analizaron 670 muestras de orina recogidas de los 598 pacientes incluidos. De estas muestras, 72 correspondieron a análisis repetidos en el seguimiento de un mismo paciente.

En la tabla 2 se presenta la distribución de las distintas indicaciones para efectuar el estudio de PCA3. En la gran mayoría de los casos (90,6%), se indicó la prueba de PCA3 por PSA elevado y biopsia previa negativa o por alteración de PSA no superior a 10 ng/ml (Tabla 2).

En los casos en que se contemplaba más de una indicación, se tuvo en cuenta la de mayor impacto según el siguiente orden:

Biopsia previa negativa > PSA elevado ( $\leq 10$  ng/ml) > Factores de riesgo para biopsia prostática > Patología benigna conocida

**Tabla 2: Indicaciones por las que se solicitó el estudio del s-PCA3**

Indicación	Número de muestras (%)
Biopsia previa negativa	337 (50,3)
PSA elevado $\leq 10$ ng/ml	270 (40,3)
Factores de riesgo para biopsia	27 (4,0)
Patología benigna conocida	20 (3,0)
No especificada	16 (2,4)
Total	670 (100)

En el grupo de pacientes con s-PCA3 positivo ( $\geq 35$ ) se habían practicado un total de 124 biopsias en el momento de cerrar la serie. De las 124 biopsias estudiadas,

56 (45,2%) fueron diagnosticadas de CaP, 11 (8,8%) de ASAP, 10 (8,0%) de HGPIIN y 47 (38,0%) de benignidad o normalidad. Al situar el punto de corte para s-PCA3 positivo en 100 o superior, el porcentaje de CaP en las biopsias aumentó hasta el 57,2%, mientras que los porcentajes de ASAP y HGPIIN no variaron significativamente (11,4% y 8,6% respectivamente) y el porcentaje de biopsias sin evidencia de malignidad disminuyó hasta el 22,8%.

En la Tabla 3 se presentan las características básicas (mediana y rango de valores) de las variables continuas estudiadas (Edad, PSA total, índice de PSA, volumen prostático, número de cilindros estudiados, porcentaje de cilindros afectados por tumor y porcentaje de tejido afectado por tumor en milímetros). Para la mayoría de las variables estudiadas, la distribución de valores no siguió una curva normal (datos no mostrados).

**Tabla 3: Valor mediano y rango de las variables continuas estudiadas.**

	<b>Mediana (Máximo-Mínimo)</b>
Edad	65 (36-89)
PSA total (ng/ml)	6 (0,6-134)
Índice de PSA	15 (0,08-123)
Volumen Prostático (cc)	53 (10-196)
Número de cilindros estudiados	11 (4-33)
Porcentaje de cilindros afectados por tumor (%)	20 (4-100)
Porcentaje de tejido afectado por tumor en mm (%)	4.1 (0,55-80,11)

## 6.2 ANÁLISIS DEL s-PCA3

La determinación del s-PCA3 dio un resultado válido en el 98,2% de las 670 muestras de orina analizadas. La media del s-PCA3 fue 47,3. De las 670 muestras de orina analizadas, 365 (54,5%) tuvieron un s-PCA3 negativo, 293 (43,7%) un s-PCA3 positivo y 12 (1,8%) resultaron no valorables. Se consideran muestras no valorables aquellas que presentan un número de moléculas de ARNm de PSA por debajo del límite de detección de la técnica, en estos casos se considera que en la muestra de orina hay una representación insuficiente de células prostáticas y se solicita una nueva muestra en la que repetir el estudio.

Excluyendo las muestras repetidas, de los 598 pacientes incluidos, 323 (54%) tuvieron un s-PCA3 negativo, 273 (45,7%) un s-PCA3 positivo y 2 (0,3%) fueron no valorables. Para estudiar la relación entre variables, se consideraron únicamente los valores de los 598 pacientes incluidos en el estudio. Cuando un paciente tenía más de una determinación de s-PCA3, se consideró únicamente la más reciente.

### 6.2.1 RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y VARIABLES CONTÍNUAS

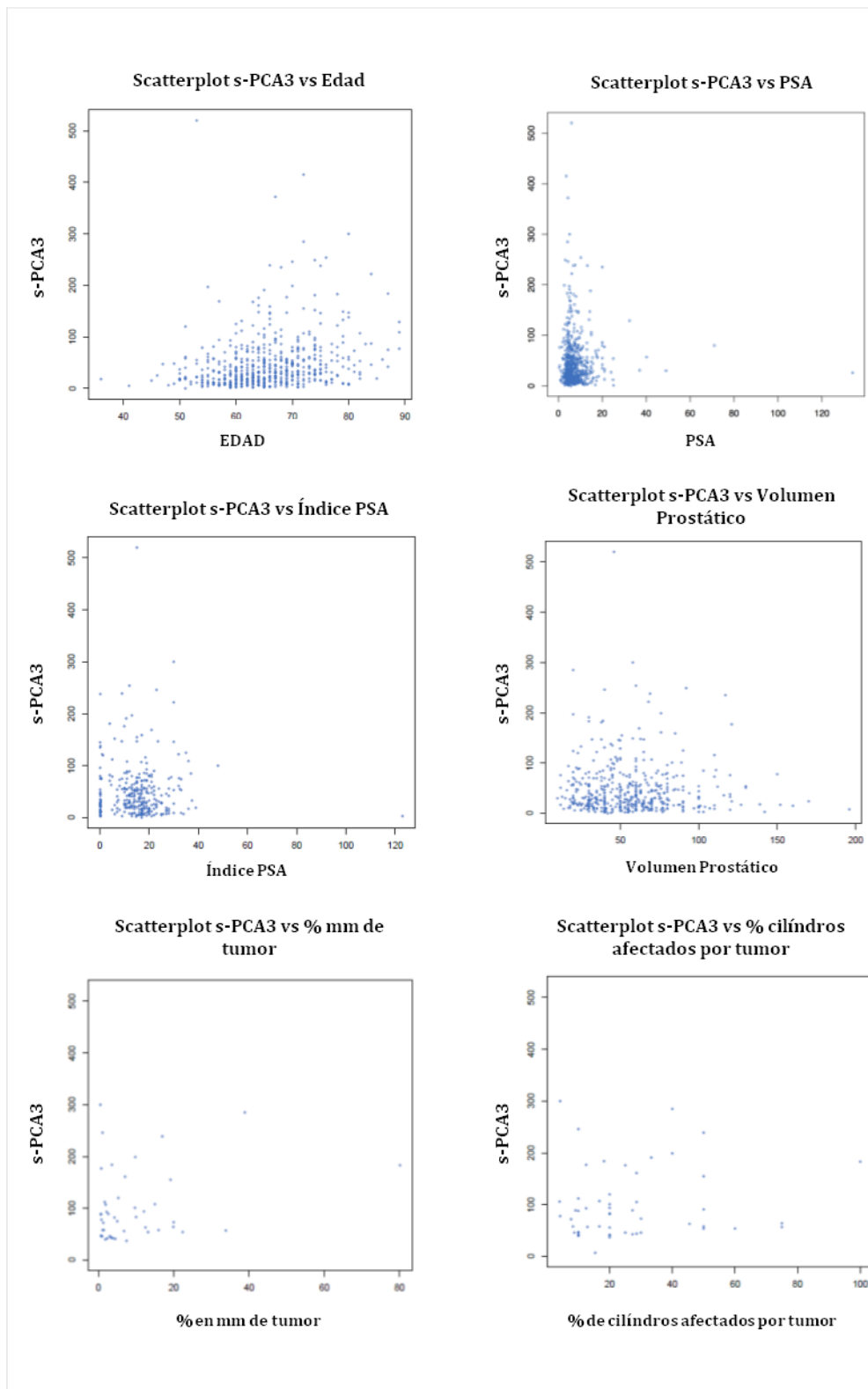
Para visualizar la relación entre el s-PCA3 y cada una de las seis variables continuas estudiadas (edad, PSA total, índice de PSA, volumen prostático, porcentaje de cilindros de biopsia afectados y porcentaje de milímetros afectados por tumor respecto a la longitud total de los cilindros tisulares estudiados), se crearon unos diagramas de dispersión (*scatterplots*) entre pares de variables (Figura 41). En general, los diagramas indicaron una correlación débil entre s-PCA3 y el resto de las variables. Para cuantificar esta relación, se llevó a cabo un

análisis de regresión, utilizando dos aproximaciones diferentes, una paramétrica y una no paramétrica.

Los resultados de la regresión lineal simple (método paramétrico) se presentan en la Tabla 4. El análisis indicó una correlación casi nula entre (i) s-PCA3 y edad; (ii) s-PCA3 y PSA total; (iii) s-PCA3 e índice PSA y (iv) s-PCA3 y volumen prostático. El mismo análisis indicó una correlación muy débil entre (i) s-PCA3 y porcentaje de mm afectados por carcinoma (ii) s-PCA3 y porcentaje de cilindros afectados. Sólo en el modelo  $s\text{-PCA3} \sim \text{edad}$  el coeficiente  $r$  se mostró significativamente diferente a 0 ( $p\text{-valor} = 3,374 \times 10^{-8}$ ), a pesar de ser casi nulo. En el resto de los modelos, todas las variables explicativas no tuvieron ningún efecto estadísticamente significativo en el s-PCA3 ( $p\text{-valor} > 0,05$ ). En todo caso, el porcentaje de varianza explicada en cada modelo era muy bajo, superando apenas el 7% en el mejor de los casos (7,199% en el modelo  $s\text{-PCA3} \sim \% \text{ mm tumor}$ ).

**Tabla 4: Resultados de la regresión lineal simple entre s-PCA3 y una serie de variables continuas**

	Coefficiente $r$	p-valor	% Varianza expl.
s-PCA3 ~ edad	0,023	$3,374 \times 10^{-8}$	5,062%
s-PCA3 ~ PSA total	0,007	0,866	0,000%
s-PCA3 ~ índice PSA	0,021	0,721	0,043%
s-PCA3 ~ vol. prostático	0,021	0,650	0,043%
s-PCA3 ~ % mm tumor	0,268	0,071	7,199%
s-PCA3 ~ % cilindros afect.	0,113	0,424	1,283%



**Figura 41: Diagramas de dispersión (Scatterplots) entre s-PCA3 y los valores continuos estudiados.**

Los resultados de la regresión de Spearman (método no paramétrico) se presentan en la Tabla 5. El análisis indicó una correlación nula y no significativa ( $p > 0,05$ ) entre (i) s-PCA3 y PSA total; (ii) s-PCA3 e índice PSA y (iii) s-PCA3 y volumen prostático. El mismo análisis indicó una correlación muy débil y no significativa ( $p > 0,05$ ) entre (i) s-PCA3 y porcentaje de mm afectados por carcinoma y (ii) s-PCA3 y porcentaje de cilindros afectados. En cambio, el análisis indicó una correlación intermedia y significativa entre s-PCA3 y la edad ( $\rho = 0,298$ ;  $p\text{-valor} = 3,857 \times 10^{-8}$ ). En este aspecto, el método no paramétrico supone una mejora comparado con el paramétrico para detectar una relación entre el s-PCA3 y la edad.

**Tabla 5: Resultados de regresión de Spearman entre s-PCA3 y una serie de variables continuas**

	Coeficiente $\rho$	p-valor
s-PCA3 ~ edad	0,298	$3,857 \times 10^{-8}$
s-PCA3 ~ PSA total	0,000	0,994
s-PCA3 ~ índice PSA	-0,043	0,456
s-PCA3 ~ vol. prostático	-0,028	0,5438
s-PCA3 ~ % mm tumor	0,101	0,503
s-PCA3 ~ % cilindros afect.	0,091	0,523

Merece la pena destacar que, en todos los modelos examinados, tanto la regresión lineal simple como la regresión de Spearman fueron concordantes en cuanto a

significación estadística. En general, ambos análisis de regresión establecen la falta de correlación entre el s-PCA3 y cualquiera de las variables continuas estudiadas, con la posible excepción de la edad, la cual se mostró débilmente correlacionada con el s-PCA3. Aun así, los datos indican que, para ser más completo, un modelo explicativo del s-PCA3 debería incluir más variables además de la edad.

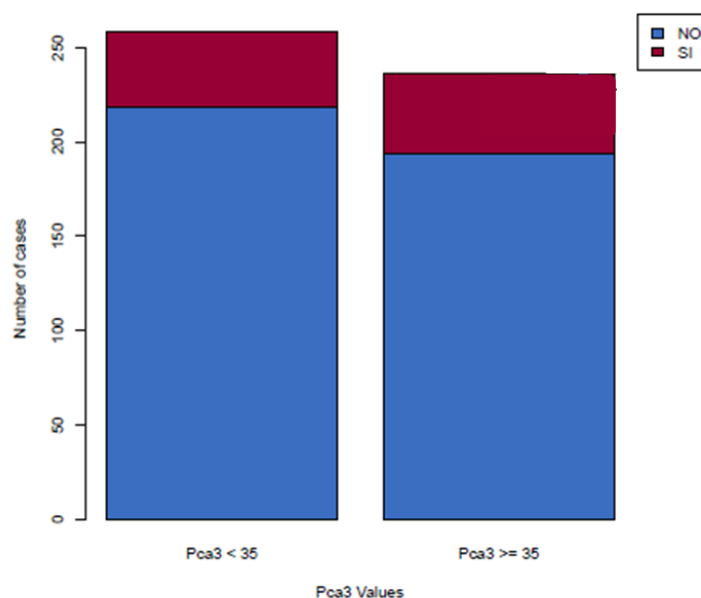
### **6.2.2 RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y VARIABLES CATEGÓRICAS**

Para estudiar la relación entre el s-PCA3 y las cinco variables categóricas (presencia de prostatitis, resultado de la biopsia prostática, grado de Gleason, porcentaje de milímetros de tejido afectados por carcinoma y porcentaje de cilindros afectados por carcinoma), se han construido tres versiones diferentes de tablas de contingencia: (i) tablas 2×2 (el caso más común en el análisis de asociación), (ii) tablas 3×2 y (iii) “tablas” 3×2×2 (en el caso del análisis log-lineal). Debido a que el s-PCA3, el grado de Gleason, el porcentaje de milímetros afectados por tumor y el porcentaje de cilindros afectados son variables numéricas, sus valores fueron agrupados en diversas categorías, siempre basadas en hipótesis con un sentido biológico. A continuación, se presentan los resultados de los análisis y una breve justificación de cada agrupación.

#### ***s-PCA vs. prostatitis***

Para estudiar la relación entre el s-PCA3 y la presencia o ausencia de prostatitis, los valores de s-PCA3 fueron agrupados en dos categorías: valores positivos ( $s\text{-PCA3} \geq 35$ ) y valores negativos ( $s\text{-PCA3} < 35$ ). El número de pacientes en cada

intervalo de s-PCA3 y la presencia o ausencia de prostatitis se representa en la Figura 42.



**Figura 42: Distribución de los pacientes en función del s-PCA3 y la presencia/ausencia de prostatitis (sí/no).**

La Tabla 6 muestra las frecuencias observadas organizadas en una tabla 2×2. La prueba exacta de Fisher indicó una asociación sugestiva pero no significativa entre el s-PCA3 y la presencia de prostatitis (p-valor = 0,055).

**Tabla 6: Tabla de contingencia para las categorías dicotómicas de s-PCA3 y prostatitis.**

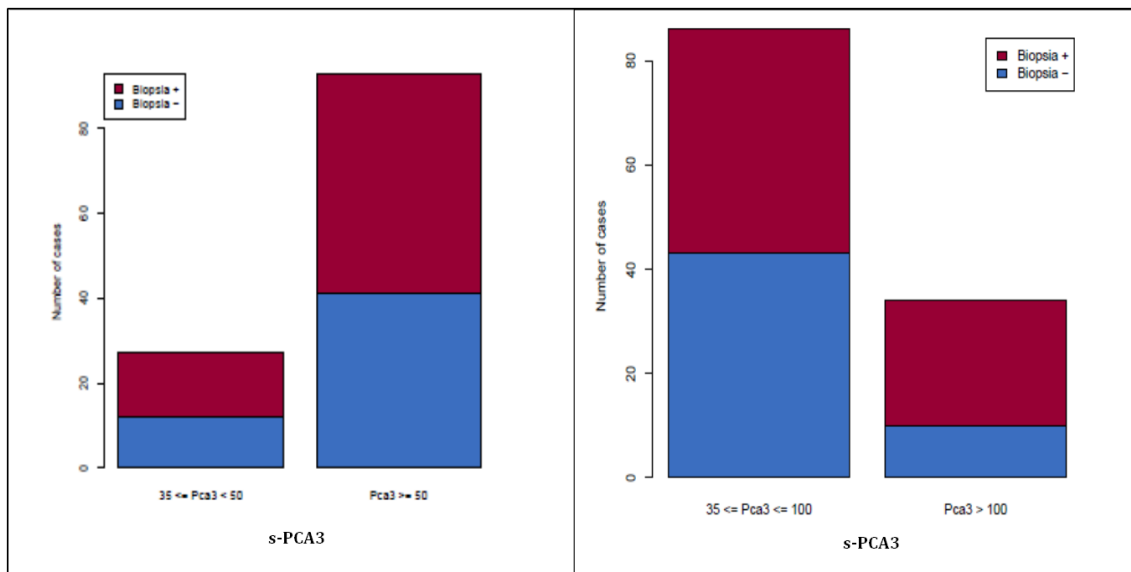
	Ausencia de prostatitis	Presencia de prostatitis
<i>s-PCA3</i> < 35	218	40
<i>s-PCA3</i> ≥ 35	194	42

***s-PCA vs. Resultado de la biopsia***

La relación entre s-PCA3 y el resultado de la biopsia posterior se estudió considerando dos notas de corte diferentes para los s-PCA3 positivos. Por un lado, se aplicó la nota de corte = 50, creando los siguientes dos grupos de valores:

(i)  $35 \leq \text{s-PCA3} < 50$ , y (ii)  $\text{s-PCA3} \geq 50$ . Un estudio reciente recomienda esta nota de corte para identificar pacientes con alto riesgo de desarrollar CaP y que son candidatos para prostatectomía radical (van Poppel, et al. 2012). Por otro lado, se aplicó la nota de corte = 100. Esta categorización creó dos grupos de s-PCA3 positivos: (i)  $35 \leq \text{s-PCA3} < 100$  y (ii)  $\text{s-PCA3} \geq 100$ . Otros estudios argumentaron que una nota de corte = 100 es más aconsejable ya que produce resultados más reproducibles (Roobol, et al. 2010).

El número de pacientes en cada intervalo de s-PCA3 positivo (según cada una de las dos diferentes agrupaciones) con respecto a una biopsia positiva o negativa se representa en la Figura 43.



**Figura 43: Distribución de los pacientes en función del rango de s-PCA3 (según la nota de corte = 50 y 100) y el resultado de la biopsia posterior.**

Las Tablas 7 y 8 muestran las frecuencias observadas organizadas en tablas 2×2. La prueba exacta de Fisher no indicó ninguna asociación entre el s-PCA3 y el resultado de la biopsia posterior cuando la nota de corte de la agrupación fue de 50 (p-valor = 1.00). En cambio, cuando la nota de corte era 100, la prueba de Fisher mostró una asociación significativa entre el s-PCA y el resultado de la biopsia posterior (p-valor = 0.044).

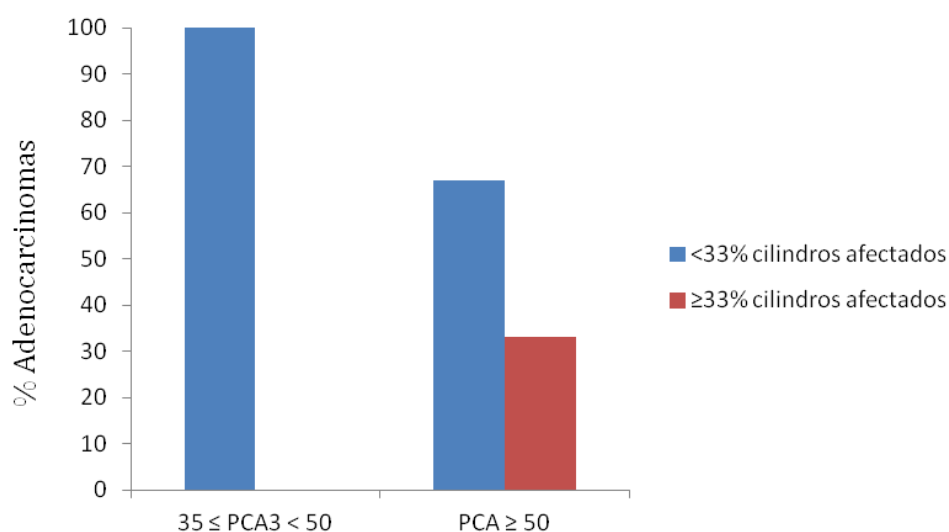
**Tabla 7: Frecuencias observadas de s-PCA3 positivos en dos intervalos: 35-50 y ≥ 50, y el resultado de la biopsia posterior**

	Biopsia negativa	Biopsia positiva
<b>35 ≤ s-PCA3 &lt; 50</b>	12	15
<b>s-PCA3 ≥ 50</b>	41	52

**Tabla 8: Frecuencias observadas de s-PCA3 positivos en dos intervalos: 35-100 y  $\geq 100$ , y el resultado de la biopsia posterior**

	<b>Biopsia negativa</b>	<b>Biopsia positiva</b>
<b><math>35 \leq s\text{-PCA3} &lt; 100</math></b>	43	43
<b><math>s\text{-PCA3} \geq 100</math></b>	10	24

Para completar la información, se ha estudiado también la relación entre el s-PCA3 (nota de corte = 50) y el porcentaje de cilindros afectados por tumor (nota de corte = 33%) en las biopsias con diagnóstico de CaP. Esta nota de corte del 33% de cilindros afectados, se utiliza en el estudio microscópico de biopsias prostáticas como valor orientativo para predecir el volumen tumoral. La Figura 44 muestra la distribución del porcentaje de los pacientes con CaP en función de los dos parámetros descritos.



**Figura 44: Distribución del porcentaje de los pacientes diagnosticados de CaP en función del s-PCA3 ( $35 \leq \text{s-PCA3} < 50$ ;  $\text{s-PCA3} \geq 50$ ) y el porcentaje de cilindros afectados por tumor (nota de corte = 33%).**

La Tabla 9 muestra las frecuencias observadas organizadas en una tabla de contingencia  $2 \times 2$ . La prueba exacta de Fisher indicó una asociación significativa entre el s-PCA3 y el porcentaje de cilindros afectados por carcinoma (p-valor = 0.023).

**Tabla 9: Frecuencias observadas de s-PCA3 positivos en dos intervalos: 35-50 y  $\geq 50$ , y el resultado de la biopsia posterior**

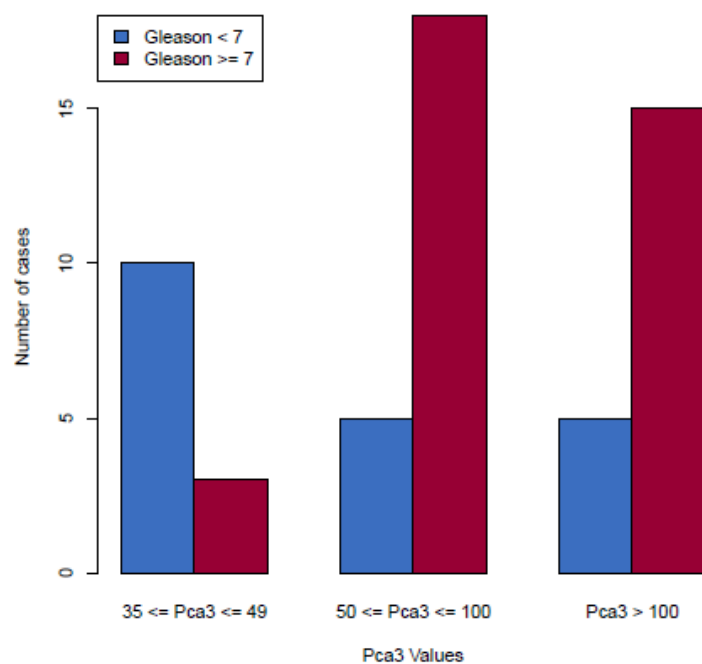
	% cilindros < 33%	% cilindros $\geq 33\%$
$35 \leq \text{s-PCA3} < 50$	12	0
$\text{s-PCA3} \geq 50$	26	13

***s-PCA vs. grado de Gleason en biopsias con diagnóstico de CaP***

Para investigar la relación entre s-PCA3 y el grado de Gleason en 56 biopsias con diagnóstico de CaP, los valores del s-PCA3 fueron divididos en tres grupos:

(i)  $35 \leq \text{s-PCA3} < 50$ , (ii)  $50 \leq \text{s-PCA3} < 100$ , y (iii)  $\text{s-PCA3} \geq 100$ . Asimismo, los valores del grado de Gleason fueron agrupados en dos intervalos:

(i) grado de Gleason  $< 7$  y (ii) grado de Gleason  $\geq 7$ . La distribución del número de pacientes con CaP en cada rango de s-PCA3 y en cada intervalo de grado de Gleason se muestra en la Figura 45.



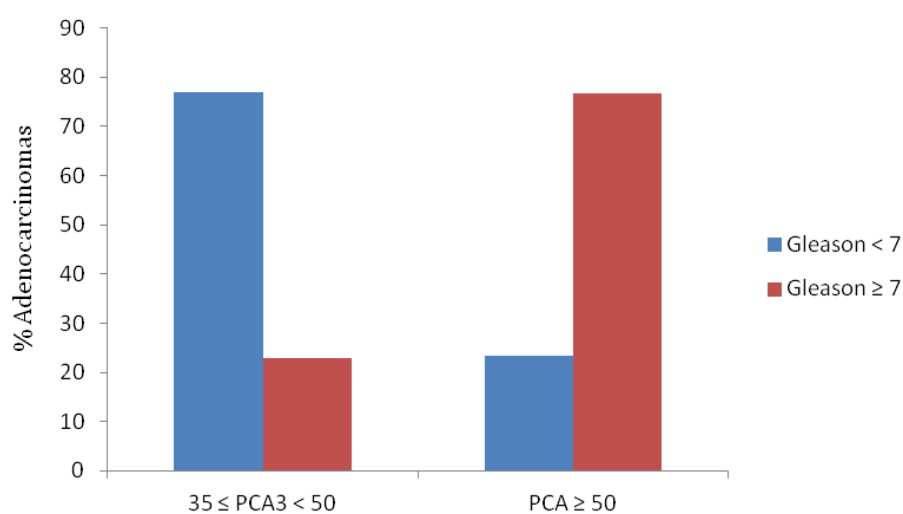
**Figura 45: Distribución de los pacientes diagnosticados de CaP, en función del rango de s-PCA3 ( $35 \leq \text{s-PCA3} < 50$ ,  $50 \leq \text{s-PCA3} \leq 100$  y  $\text{s-PCA3} > 100$ ) y el grado de Gleason.**

La Tabla 10 muestra las frecuencias observadas organizadas en una tabla 3×2. La prueba exacta de Fisher indicó una asociación significativa entre el s-PCA3 y el grado de Gleason en los casos con diagnóstico de CaP (p-valor = 0,0025).

**Tabla 10: Tabla de frecuencias observadas de s-PCA3 en dos grupos de biopsias según el grado de Gleason.**

	<b>Gleason &lt; 7</b>	<b>Gleason ≥ 7</b>
<b><math>35 \leq s\text{-PCA3} &lt; 50</math></b>	10	3
<b><math>50 \leq s\text{-PCA3} \leq 100</math></b>	5	18
<b><math>s\text{-PCA3} &gt; 100</math></b>	5	15

Se estudió también la relación entre s-PCA3 y el grado de Gleason en las mismas biopsias con diagnóstico de CaP, dividiendo los valores del s-PCA3 en dos grupos: (i)  $35 \leq s\text{-PCA3} < 50$  y (ii)  $s\text{-PCA3} \geq 50$ . Los valores del grado de Gleason fueron agrupados de la misma manera que en el cálculo anterior, en dos intervalos: (i) grado de Gleason < 7 y (ii) grado de Gleason ≥ 7. La distribución del porcentaje de pacientes con CaP en cada rango de s-PCA3 y en cada intervalo de grado de Gleason se muestra en la Figura 46.



**Figura 46: Distribución de los pacientes diagnosticados de CaP, en función del rango de s-PCA3 ( $35 \leq s\text{-PCA3} < 50$ , y  $s\text{-PCA3} \geq 50$ ) y el grado de Gleason.**

La Tabla 11 muestra las frecuencias observadas organizadas en una tabla 2×2. La prueba exacta de Fisher indicó una asociación significativa entre el s-PCA3 y el grado de Gleason en los casos con diagnóstico de CaP (p-valor = 0,002).

**Tabla 11: Tabla de frecuencias observadas de s-PCA3 en dos grupos de biopsias según el grado de Gleason.**

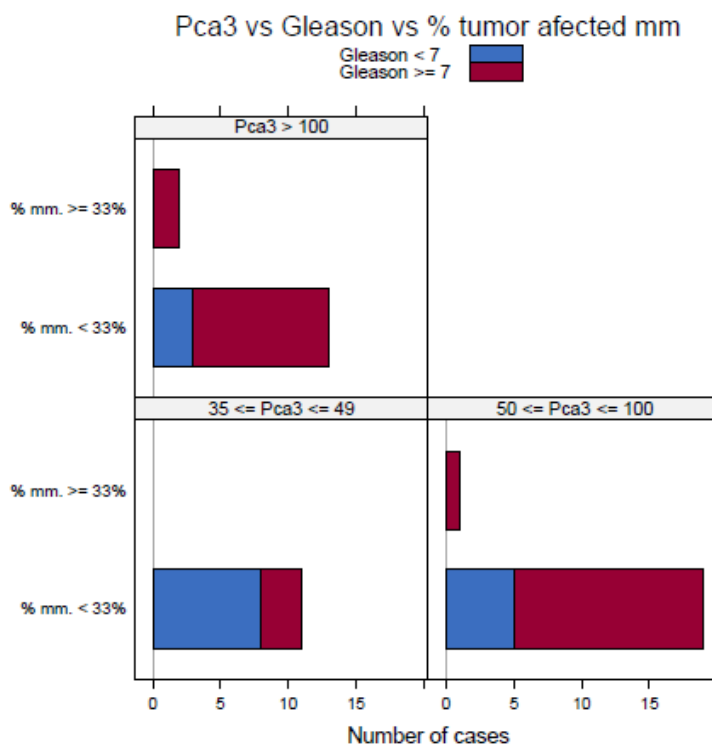
	Gleason < 7	Gleason ≥ 7
$35 \leq s\text{-PCA3} < 50$	10	3
$s\text{-PCA3} \geq 50$	10	33

***s-PCA vs. score de Gleason vs. porcentaje de milímetros afectados por tumor en biopsias con diagnóstico de CaP***

Para estudiar la relación entre el s-PCA3, el grado de Gleason y el porcentaje de milímetros afectados por tumor en la biopsia, se analizaron datos de 46 biopsias

con diagnóstico CaP de los que se disponía de toda la información. La agrupación de valores de cada variable fue la siguiente: s-PCA3 en tres rangos:

(i)  $35 \leq \text{s-PCA3} < 50$ , (ii)  $50 \leq \text{s-PCA3} < 100$  y (iii)  $\text{s-PCA3} \geq 100$ ; grado de Gleason en dos rangos: (i) Gleason  $< 7$  y (ii) Gleason  $\geq 7$ ; porcentaje de milímetros afectados por tumor: (i)  $< 33\%$  y (ii)  $\geq 33\%$ . La Figura 47 muestra la distribución del número de casos estudiados en función de las tres variables.



**Figura 47: Representación del número de casos en función del s-PCA3, el grado de Gleason y el % de milímetros afectados por tumor.**

La Tabla 12 muestra las frecuencias observadas en cada una de las  $3 \times 2 \times 2 = 12$  categorías de valores:

**Tabla 12: Descripción de los casos categorizados según porcentaje de milímetros afectados por el tumor, s-PCA3 y grado de Gleason**

	<b>% milímetros afectados por tumor</b>	<b>s-PCA3</b>	<b>Grado de Gleason</b>	<b>Frecuencia observada</b>
<b>1</b>	< 33	$35 \leq \text{s-PCA3} < 50$	< 7	8
<b>2</b>	$\geq 33$	$35 \leq \text{s-PCA3} < 50$	< 7	0
<b>3</b>	< 33	$50 \leq \text{s-PCA3} \leq 100$	< 7	5
<b>4</b>	$\geq 33$	$50 \leq \text{s-PCA3} \leq 100$	< 7	0
<b>5</b>	< 33	$\text{s-PCA3} > 100$	< 7	3
<b>6</b>	$\geq 33$	$\text{s-PCA3} > 100$	< 7	0
<b>7</b>	< 33	$35 \leq \text{s-PCA3} < 50$	$\geq 7$	3
<b>8</b>	$\geq 33$	$35 \leq \text{s-PCA3} < 50$	$\geq 7$	0
<b>9</b>	< 33	$50 \leq \text{s-PCA3} \leq 100$	$\geq 7$	14
<b>10</b>	$\geq 33$	$50 \leq \text{s-PCA3} \leq 100$	$\geq 7$	1
<b>11</b>	< 33	$\text{s-PCA3} > 100$	$\geq 7$	10
<b>12</b>	$\geq 33$	$\text{s-PCA3} > 100$	$\geq 7$	2

A los datos de la Tabla 12, primero se les aplicó el algoritmo *stepwise* para seleccionar el modelo más parsimonioso según el criterio de información AIC. El análisis *stepwise* indicó que el modelo más parsimonioso consistió de los siguientes componentes (un asterisco indica interacción entre variables):

s-PCA3 + % mm afectados + score de Gleason + s-PCA3\*score de Gleason + % mm afectados\*score de Gleason

Según el análisis, la interacción entre las tres variables (s-PCA3\*score de Gleason\*% de milímetros afectados) no es significativa, y tampoco lo es la interacción s-PCA3\*% de milímetros afectados.

Utilizando los componentes que propone el análisis *stepwise*, se ha vuelto a analizar el modelo log-lineal. Los resultados del análisis se resumen en la Tabla 13. El modelo nulo (todas las frecuencias son iguales) se encuentra en la parte superior de la Tabla. Claramente, el modelo nulo no es suficiente para describir este conjunto de datos, ya que la adición de componentes produce reducciones significativas en el estadístico  $\chi^2$ . En cada paso, se añade otro componente más y esto elimina la cantidad de  $\chi^2$  que se muestra en la columna correspondiente, dejando la cantidad que aparece en la columna " $\chi^2$  residual". El p-valor en cada fila se calcula a partir del cambio en el  $\chi^2$  y en los grados de libertad producido por la adición de ese componente en el modelo. Las reducciones significativas del  $\chi^2$  son las más relevantes indicando que el nuevo componente agregado mejoró el modelo.

**Tabla 13: Tabla de resultados del modelo log-lineal**

	gl	$\chi^2$	gl residual	$\chi^2$ residual	p-valor
<b>Modelo nulo</b>			11	61,64	
<b>s-PCA3</b>	2	2,66	9	58,98	0,264
<b>% mm afectados</b>	1	41,59	8	17,39	0,000
<b>Gleason</b>	1	4,33	7	13,06	0,038
<b>s-PCA3*Gleason</b>	2	9,04	5	4,02	0,011
<b>% mm*Gleason</b>	1	2,68	4	1,34	0,102

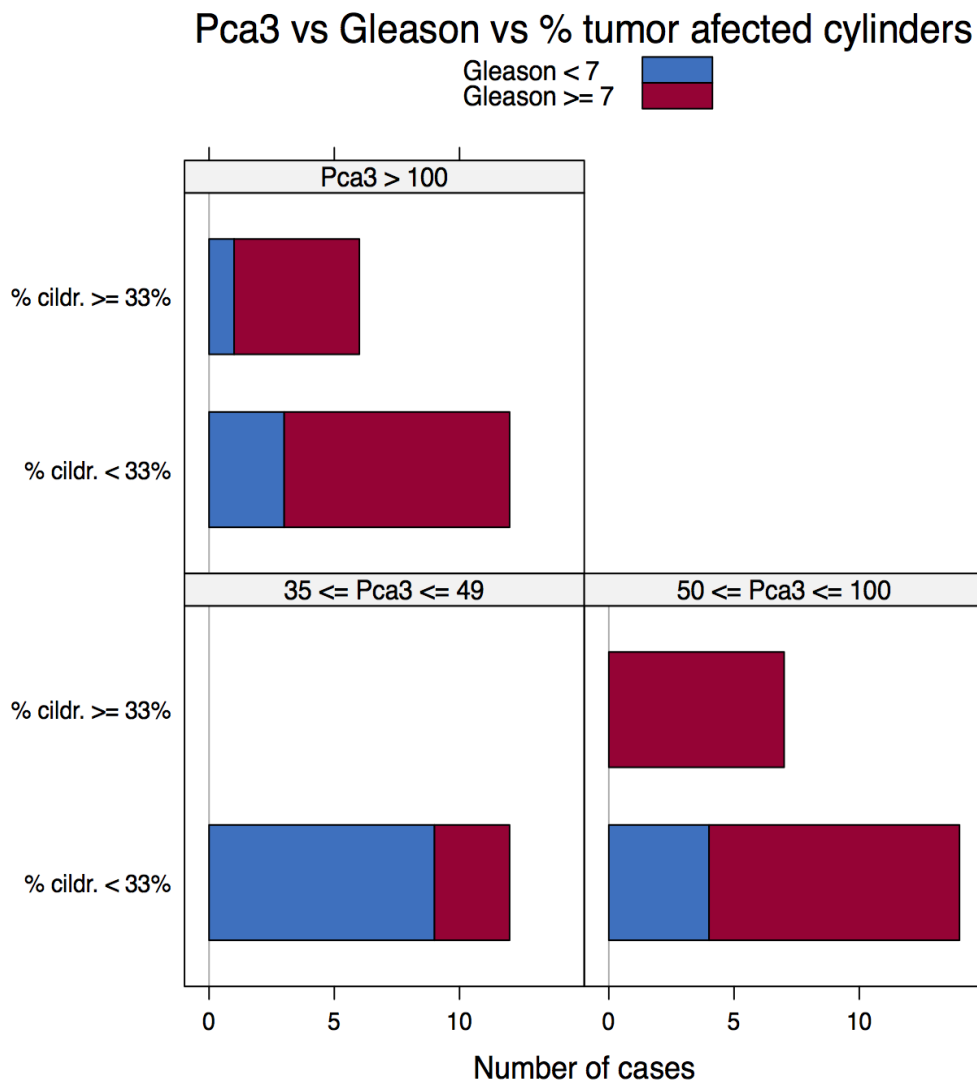
gl: grados de libertad

Este modelo en concreto concluye en un  $\chi^2$  residual = 1,34 y 4 grados de libertad. Utilizando estos valores, se aplicó una prueba  $\chi^2$  planteando como hipótesis nula que las frecuencias observadas en la población de estudio cumplen con el modelo especificado arriba. La prueba no mostró una partida estadísticamente significativa de la hipótesis nula (p-valor = 0,854), por lo que concluye que el modelo ajusta los valores de manera correcta. El modelo final considera significativa la interacción entre el s-PCA3 y el grado de Gleason (p-valor = 0,011).

***s-PCA vs. grado de Gleason vs. Porcentaje de cilindros afectados por tumor en biopsias con diagnóstico de CaP***

Finalmente, para estudiar la relación entre el s-PCA3, el grado de Gleason y el porcentaje de cilindros afectados por tumor en la biopsia, se analizaron los mismos datos de las 51 biopsias con diagnóstico CaP de los que se disponía de toda la información. Se analizaron los datos considerando dos agrupaciones diferentes para el s-PCA3.

En la primera agrupación de valores de cada variable se utilizaron los mismos criterios que en el análisis log-lineal anterior. La Figura 48 muestra la distribución del número de casos estudiados en función de las tres variables.



**Figura 48: Representación del número de casos en función del s-PCA3, el grado de Gleason y el porcentaje de cilindros afectados por tumor.**

La Tabla 14 muestra las frecuencias observadas en cada una de las  $3 \times 2 \times 2 = 12$  categorías de valores:

**Tabla 14: Descripción de los casos categorizados según el porcentaje de cilindros afectados por tumor, s-PCA3 y grado de Gleason.**

	% cilindros afectados por tumor	s-PCA3	Grado de Gleason	Frecuencia observada
<b>1</b>	< 33	$35 \leq \text{s-PCA3} < 50$	< 7	9
<b>2</b>	$\geq 33$	$35 \leq \text{s-PCA3} < 50$	< 7	0
<b>3</b>	< 33	$50 \leq \text{s-PCA3} \leq 100$	< 7	4
<b>4</b>	$\geq 33$	$50 \leq \text{s-PCA3} \leq 100$	< 7	0
<b>5</b>	< 33	$\text{s-PCA3} > 100$	< 7	3
<b>6</b>	$\geq 33$	$\text{s-PCA3} > 100$	< 7	1
<b>7</b>	< 33	$35 \leq \text{s-PCA3} < 50$	$\geq 7$	3
<b>8</b>	$\geq 33$	$35 \leq \text{s-PCA3} < 50$	$\geq 7$	0
<b>9</b>	< 33	$50 \leq \text{s-PCA3} \leq 100$	$\geq 7$	10
<b>10</b>	$\geq 33$	$50 \leq \text{s-PCA3} \leq 100$	$\geq 7$	7
<b>11</b>	< 33	$\text{s-PCA3} > 100$	$\geq 7$	9
<b>12</b>	$\geq 33$	$\text{s-PCA3} > 100$	$\geq 7$	5

Al igual que antes, a los datos de la Tabla 14, se les aplicó el algoritmo *stepwise* para seleccionar el modelo más parsimonioso según el criterio de información AIC. El análisis *stepwise* indicó que dicho modelo consistió de los siguientes componentes:

$\text{s-PCA3} + \% \text{ cilindros afectados} + \text{score de Gleason} + \text{s-PCA3} * \% \text{ cilindros afectados} + \text{s-PCA3} * \text{score de Gleason} + \% \text{ cilindros afectados} * \text{score de Gleason}$

Según este análisis, la interacción entre las tres variables ( $\text{s-PCA3} * \text{score de Gleason} * \% \text{ de cilindros afectados}$ ) no es significativa.

Utilizando los componentes que propone el análisis stepwise, se ha vuelto a analizar el modelo log-lineal. Los resultados del análisis se resumen en la Tabla 15:

**Tabla 15: Tabla de resultados del modelo log-lineal**

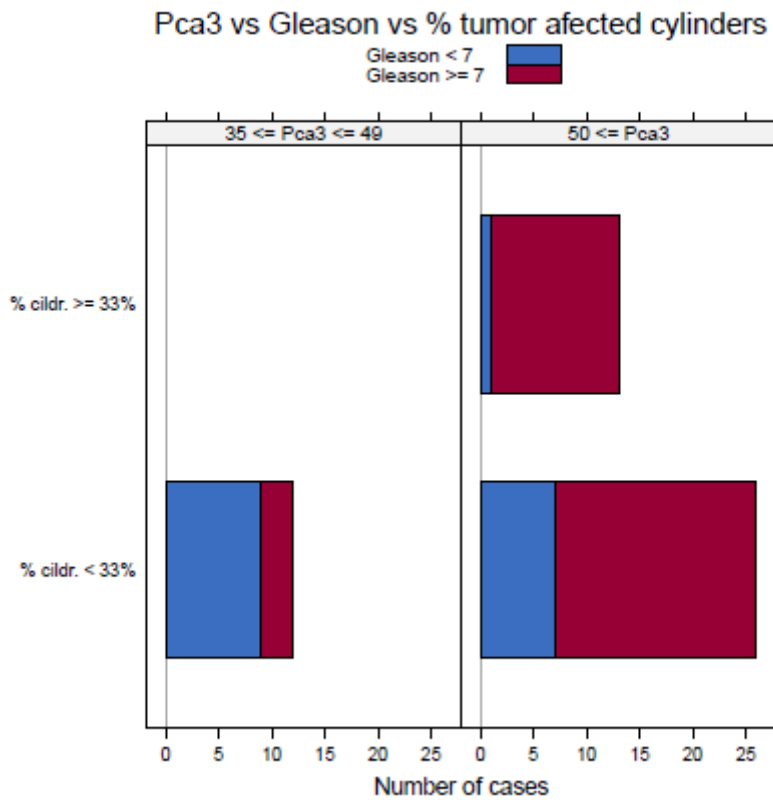
	gl	$\chi^2$	gl residual	$\chi^2$ residual	p-valor
<b>Modelo nulo</b>			11	45,18	
<b>s-PCA3</b>	2	2,57	9	42,60	0,276
<b>% cilindros afectados</b>	1	12,80	8	29,80	0,000
<b>Gleason</b>	1	5,78	7	24,03	0,016
<b>s-PCA3*% cilindros</b>	2	8,25	5	15,77	0,016
<b>s-PCA3*Gleason</b>	2	11,91	3	3,87	0,003
<b>% cilindros*Gleason</b>	1	2.24	2	1,62	0,134

gl: grados de libertad

Este modelo concluye en un  $\chi^2$  residual = 1,62 y 2 grados de libertad. Utilizando estos valores, se aplicó una prueba  $\chi^2$  planteando como la misma hipótesis nula que antes (las frecuencias observadas en la población de estudio cumplen con el modelo). La prueba no mostró una partida estadísticamente significativa de la hipótesis nula (p-valor = 0,444), por lo que concluye que el modelo ajusta los valores de manera correcta. El modelo final considera significativa la interacción entre (i) el s-PCA3 y el porcentaje de cilindros afectados (p-valor = 0.016), y (ii) el s-PCA3 y el grado de Gleason (p-valor = 0,003).

En el segundo análisis de los datos. La agrupación de valores de cada variable fue la siguiente: s-PCA3 en dos rangos: (i)  $35 \leq \text{s-PCA3} < 50$  y (ii)  $\text{s-PCA3} \geq 50$ ; grado de Gleason en dos rangos: (i)  $\text{Gleason} < 7$  y (ii)  $\text{Gleason} \geq 7$ ; porcentaje de cilindros

afectados por tumor: (i)  $< 33\%$  y (ii)  $\geq 33\%$ . La Figura 49 muestra la distribución del número de casos estudiados en función de las tres variables.



**Figura 49: Representación del número de casos en función del s-PCA3, el grado de Gleason y el porcentaje de cilindros afectados por tumor.**

La Tabla 16 muestra las frecuencias observadas en cada una de las  $2 \times 2 \times 2 = 8$  categorías de valores:

**Tabla 16: Descripción de los casos categorizados según % de cilindros afectados por el tumor, s-PCA3 y grado de Gleason**

	% cilindros afectados por tumor	s-PCA3	Score de Gleason	Frecuencia observada
1	< 33	$35 \leq \text{s-PCA3} < 50$	< 7	9
2	$\geq 33$	$35 \leq \text{s-PCA3} < 50$	< 7	0
3	< 33	$\text{PCA3} \geq 50$	< 7	7
4	$\geq 33$	$\text{PCA3} \geq 50$	< 7	1
5	< 33	$35 \leq \text{s-PCA3} < 50$	$\geq 7$	3
6	$\geq 33$	$35 \leq \text{s-PCA3} < 50$	$\geq 7$	0
7	< 33	$\text{PCA3} \geq 50$	$\geq 7$	19
8	$\geq 33$	$\text{PCA3} \geq 50$	$\geq 7$	12

Al igual que antes, a los datos de la Tabla 16, se les aplicó el algoritmo *stepwise* para seleccionar el modelo más parsimonioso según el criterio de información AIC. El análisis *stepwise* indicó que dicho modelo consistió de los siguientes componentes:

s-PCA3 + % cilindros afectados + score de Gleason + s-PCA3\*% cilindros afectados + s-PCA3\*score de Gleason + % cilindros afectados\*score de Gleason

Según este análisis, la interacción entre las tres variables (s-PCA3\*score de Gleason\*% de cilindros afectados) no es significativa.

Utilizando los componentes que propone el análisis *stepwise*, se ha vuelto a analizar el modelo log-lineal. Los resultados del análisis se resumen en la Tabla 17:

**Tabla 17: Tabla de resultados del modelo log-lineal**

	<b>gl</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>gl residual</b>	<b><math>\chi^2</math> residual</b>	<b>p-valor</b>
<b>Modelo nulo</b>			7	55,97	
<b>s-PCA3</b>	1	15,05	6	40,92	0,000
<b>% cilindros afectados</b>	1	12,80	5	28,12	0,000
<b>Gleason</b>	1	5,78	4	22,34	0,016
<b>s-PCA3*% cilindros</b>	1	8,25	3	14,09	0,004
<b>s-PCA3*Gleason</b>	1	11,85	2	2,24	0,001
<b>% cilindros*Gleason</b>	1	2.24	1	0,00	0,135

gl: grados de libertad

Este modelo concluye en un  $\chi^2$  residual = 0,00 y 1 grado de libertad. Utilizando estos valores, se aplicó una prueba  $\chi^2$  planteando como la misma hipótesis nula que antes (las frecuencias observadas en la población de estudio cumplen con el modelo). La prueba no mostró una partida estadísticamente significativa de la hipótesis nula (p-valor = 1,00), por lo que concluye que el modelo ajusta los valores de manera correcta. El modelo final considera significativa la interacción entre (i) el s-PCA3 y el porcentaje de cilindros afectados (p-valor = 0.004), y (ii) el s-PCA3 y el grado de Gleason (p-valor = 0,001).



## **7 DISCUSIÓN**



## 7.1 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha estudiado el impacto del análisis de expresión del gen *PCA3* en el manejo clínico de pacientes urológicos que muestran valores de PSA alterados. La importancia diagnóstica del *PCA3* se basa en que, por la alta especificidad para el carcinoma de próstata que se le ha atribuido, puede representar un nuevo recurso alternativo o complementario al análisis de PSA y tacto rectal sobre los que se sustenta en la actualidad el diagnóstico clínico del cáncer de próstata.

Como en el caso de cualquier biomarcador de CaP, el objetivo principal es evaluar si el uso del *PCA3* puede mejorar la eficiencia del cribado, evitando biopsias innecesarias y reducir el sobrediagnóstico y el sobretratamiento. Por tanto, en el curso del estudio se ha prestado especial atención a la relación del s-*PCA3* - la medida estándar de los niveles de expresión del *PCA3* - con la reducción de la indicación de biopsias prostáticas pero también se ha investigado la presunta capacidad del *PCA3* para predecir la agresividad tumoral en pacientes ya diagnosticados de CaP, buscando una relación entre s-*PCA3* y el volumen de tumor en las biopsias (número de cilindros afectados, porcentaje y extensión en mm) y entre s-*PCA3* y el grado de Gleason.

Este estudio es observacional, por lo que también se ha profundizado en analizar la relación entre el s-*PCA3* y una serie de parámetros clínicos adicionales de interés como la edad del paciente, el PSA sérico, el índice de PSA, el volumen prostático, la presencia de prostatitis y la presencia de HPB.

En general, las cifras de positividad y negatividad de s-PCA obtenidas en nuestra serie, 43,7 % y 54,5 % respectivamente, concuerdan con los de estudios previos con series más amplias (Day, et al. 2011; Hessels and Schalken 2009; Rubio-Briones, et al. 2011; Ruiz-Aragón and Márquez-Peláez 2010) y por otra parte, el porcentaje de casos no valorables (1,8%) es inferior al reportado en otros estudios y a las especificaciones de la compañía que comercializa el test PCA3.

Todo ello refuerza la calidad metodológica del trabajo de laboratorio y, por tanto, la fiabilidad de nuestros resultados.

### **7.1.1 RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y EDAD DEL PACIENTE**

Tanto el diagrama de dispersión (Figura 41) como los análisis de regresión (Tablas 4 y 5) indicaron la falta de una correlación fuerte entre el s-PCA3 y la edad del paciente. En consecuencia, el perfil de expresión del gen *PCA3* parece estar poco afectado por la edad del paciente.

Generalmente, con alguna excepción notable, esta observación apunta hacia la misma dirección que otros estudios basados en metodologías parecidas. Por ejemplo, en uno de los primeros estudios de expresión del *PCA3* se aplicó un análisis de regresión *Spearman* para investigar la relación entre el porcentaje de células que expresan el gen y una serie de variables sin encontrar una relación estadísticamente significativa con la edad del paciente ( $\rho = 0,03$ ; p-valor  $> 0,05$ ) (Popa, et al. 2007). En nuestro caso, el análisis de regresión *Spearman* devolvió una correlación más alta y estadísticamente significativa ( $\rho = 0,298$ ; p-valor  $\ll 0,05$ ). Esta discordancia podría ser debida a los diferentes análisis estadísticos que se han

aplicado en los dos estudios, ya que generalmente la regresión multivariada (en el caso de Popa et al.,) puede llegar a ser más conservadora que la univariada (en nuestro caso).

Otros autores realizaron un estudio indirecto de la relación entre s-PCA y la edad, a través de diversos modelos de regresión, tanto univariados como multivariados (de la Taille, et al. 2011; Haese, et al. 2008). En estos trabajos, el análisis del PCA3 tenía características de rendimiento similares tanto en los hombres menores de 65 años como en los mayores de 65 años.

### **7.1.2 RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y PSA (TOTAL Y LIBRE:TOTAL)**

En nuestro trabajo, tanto los diagramas de dispersión (Figura 41) como los análisis de regresión indicaron la falta de correlación entre (i) s-PCA3 y niveles séricos de PSA total, y (ii) s-PCA3 e índice PSA (Tablas 4 y 5).

En el caso del PSA sérico total, nuestra observación concuerda con lo que ya se conoce de la mayoría de la bibliografía. En concreto, los análisis de regresión realizados en una multitud de trabajos independientes no encontraron ninguna correlación entre la expresión del gen *PCA3* y el PSA sérico (de la Taille, et al. 2011; De Luca, et al. 2012; Popa, et al. 2007). En cambio, un análisis univariado sí encontró una relación débil entre estos dos parámetros ( $r = 0,10$ ,  $p = 0,029$ ) (Haese, et al. 2008).

Por otro lado, cuando los niveles séricos del PSA están alterados, se examina también el índice PSA. La mayor parte del PSA en la sangre está ligado a proteínas séricas; sólo una pequeña parte circula libre. El índice PSA es el porcentaje de PSA

libre. En general, un índice PSA inferior a 25% supone una mayor probabilidad de CaP.

En la bibliografía son escasos los trabajos que estudian directamente la relación entre el s-PCA3 y el índice PSA. Aun así, nuestra observación encuentra apoyo en al menos un estudio reciente que no observó ninguna correlación entre las dos variables (De Luca, et al. 2012). La mayoría de los estudios comparan el rendimiento del s-PCA3 frente al índice PSA en cuanto a su capacidad para predecir el CaP. En este aspecto, un estudio reciente mostró que el s-PCA3 fue mejor predictor del CaP que el índice PSA. En los pacientes con índice PSA > 10%, el s-PCA3 se mostró altamente correlacionado con el riesgo de presentar CaP en la segunda biopsia y útil, por tanto, para evitar biopsias prostáticas innecesarias en pacientes con valores bajos de s-PCA3 (Ploussard and de la Taille 2010).

En conclusión, a pesar de alguna discordancia puntual, nuestros análisis apuntan hacia la tendencia general de falta de correlación entre s-PCA3, PSA sérico e índice PSA, sugiriendo que los mecanismos moleculares que generan estos fenotipos son independientes entre sí.

### **7.1.3 RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y VOLUMEN PROSTÁTICO**

En nuestra serie, el s-PCA3 fue independiente del volumen prostático (Figura 41; Tablas 4 y 5), acorde con lo publicado en muchos estudios previos que se basan en diversas estrategias metodológicas. Por ejemplo, utilizando una prueba de suma de rangos *Mann-Whitney*, un estudio comparó los s-PCA3 entre pacientes agrupados según su volumen prostático (nota de corte = 40 cc). El estudio no encontró

diferencias significativas en el s-PCA3 entre los dos grupos (Ploussard and de la Taille 2010). Asimismo, un análisis de regresión paramétrico no observó ninguna correlación entre las dos variables ( $r = 0,01$ ,  $p > 0,05$ ) (de la Taille, et al. 2011). Finalmente, un estudio reciente en población española reportó que las medias de volumen prostático calculado para casos con s-PCA3 < 35 y casos con s-PCA3  $\geq$  35 no mostraban diferencias estadísticamente significativas. Este resultado persistió incluso con una nota de corte de s-PCA = 20 (Rubio-Briones, et al. 2011).

La implicación más importante de la falta de relación entre el s-PCA3 y el volumen prostático es que las limitaciones en la especificidad del PSA debido al aumento de tamaño de la próstata con la edad y/o la HPB no tienen por qué afectar a los análisis basados en el *PCA3*.

#### **7.1.4 RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y PROSTATITIS**

El análisis de asociación en nuestra serie mostró que el s-PCA3 es independiente de la presencia de prostatitis (Tabla 6). Existe discordancia en la bibliografía sobre la relación entre estas dos variables y, consecuentemente, en el valor del análisis s-PCA3 en pacientes con prostatitis crónica.

En un estudio prospectivo cuyo objetivo fue evaluar el efecto de la prostatitis crónica en el s-PCA3, éste fue negativo (< 35) en todos los pacientes con biopsia negativa (Vlaeminck-Guillem, et al. 2012). Esta observación sugiere que el análisis del *PCA3* se puede utilizar como una valiosa herramienta en los pacientes con niveles de PSA elevados y sospecha de prostatitis crónica para distinguir a aquellos que pueden beneficiarse de una biopsia prostática.

De acuerdo con nuestras observaciones, otro estudio mostró que los hombres con prostatitis crónica y HGPIN no presentaban ninguna diferencia significativa en el s-PCA3 comparados con los pacientes con próstata normal y otros con HPB (De Luca, et al. 2012). La ventaja en este caso sería que, a diferencia del PSA, el s-PCA3 parece no estar afectado por comorbilidades prostáticas benignas como la prostatitis, lo que refuerza su especificidad para el diagnóstico del CaP.

### **7.1.5 RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y BIOPSIA**

En este estudio, hemos examinado dos aspectos de la relación del s-PCA con las biopsias prostáticas. En primer lugar investigamos si la incorporación del análisis del *PCA3* reduce el número de biopsias innecesarias y, por otra parte, correlacionamos el s-PCA3 con el resultado de la biopsia, para establecer su capacidad de predicción de la existencia de carcinoma.

#### ***Relación entre s-PCA3 e indicación de biopsia***

El alto Valor Predictivo Negativo del s-PCA3 reportado en diferentes estudios (Aubin, et al. 2010; Gittelman, et al. 2013; Haese, et al. 2008; Hansen, et al. 2013; Ruiz-Aragón and Márquez-Peláez 2010) permite posponer la realización de la biopsia prostática en los casos con s-PCA3 negativo.

Nuestros resultados indicaron que la incorporación del s-PCA3 en el cribado del CaP reduce significativamente la indicación de biopsia (54,5%). Estos resultados coinciden con los reportados en metaanálisis y revisiones publicadas previamente (Hessels and Schalken 2009; Ruiz-Aragón and Márquez-Peláez 2010). Un estudio en población española valoró los índices de validez diagnóstica del *PCA3* en el

ámbito clínico, demostrando también que su incorporación mejora el cribado y reduce el número de biopsias indicadas (Rubio-Briones, et al. 2011). La reducción del 54,5% en la indicación de biopsia obtenida en nuestro estudio es un primer argumento que, junto a los datos de estudios previos, avala la introducción del *PCA3* como prueba complementaria en el manejo de pacientes sospechosos de CaP.

### ***Relación entre s-PCA3 y predicción de CaP***

En los pacientes con s-*PCA3* positivo, se incrementó notablemente la positividad de la biopsia (45,2%) respecto a la obtenida al indicarla únicamente en base a las cifras de PSA. Empleando un punto de corte de 100 para el s-*PCA3* obtenemos un 57,2% de biopsias con CaP, porcentaje ligeramente superior al reportado previamente (Rubio-Briones, et al. 2011).

La introducción del *PCA3* como prueba complementaria en el manejo de pacientes sospechosos de CaP también se apoya en el aumento de eficiencia de las biopsias (de la Taille, et al. 2011; Shariat, et al. 2011). Si con el PSA sérico y la exploración urológica el porcentaje de biopsias positivas es inferior al 40% (Remzi, et al. 2005), con el protocolo de indicaciones de *PCA3* de nuestro estudio, empleando un punto de corte mayor o igual a 35, se eleva hasta un 45,2% pero éste porcentaje llega al 54% si incluimos los casos etiquetados de ASAP que, en la experiencia de nuestro laboratorio, son altamente sugestivos de la existencia de carcinoma en la glándula y requieren nuevas biopsias. En su gran mayoría, con los criterios morfológicos y el apoyo del perfil inmunohistoquímico, interpretamos que existe un carcinoma pero que se encuentra muy poco representado en el muestreo de biopsias y requerimos mayor volumen tisular para un diagnóstico de certeza.

Cuando elevamos la nota de corte de 35 a 100, el porcentaje de biopsias positivas para carcinoma llega al 57,2 % y al 68,6 % si se incluyen los casos de ASAP.

Muchos estudios contrastan las propiedades del *PCA3* con aquellas de los genes fusionados *TMPRSS2-ERG*. Ambos biomarcadores se estudian en la orina e inevitablemente se han llevado a cabo comparaciones de su rendimiento a la hora de predecir el CaP. En un estudio reciente, el análisis del *PCA3* en 443 pacientes se mostró más preciso que el análisis de los *TMPRSS2-ERG* en la predicción de CaP (Leyten, et al. 2014), aunque otros estudios postulan lo contrario (Salami, et al. 2013).

Por último, en el único estudio sobre población española basado en 2366 pacientes, se ha mostrado que el *PCA3* es superior al PSA en la predicción de CaP (AUC: 0,748 frente a 0,601 respectivamente; diferencias estadísticamente significativas con p-valor < 0,008) (Rubio-Briones, et al. 2011).

Desde los primeros estudios efectuados se puso de manifiesto una relación directamente proporcional entre el s-*PCA3* y el porcentaje de biopsias positivas posteriores (Hessels and Schalken 2009; Rubio-Briones, et al. 2011).

#### **7.1.6 RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y UN SOLO PARÁMETRO DE AGRESIVIDAD TUMORAL**

En este trabajo se ha estudiado por separado la relación de s-*PCA3* con tres parámetros asociados con la agresividad tumoral en la biopsia: (i) el porcentaje de mm de longitud de las biopsias afectados por carcinoma, (ii) el porcentaje de cilindros afectados por tumor y (iii) el grado de Gleason.

***s-PCA3 y porcentaje de milímetros afectados por tumor***

El análisis de regresión lineal mostró una correlación sugestiva entre el s-PCA3 y el porcentaje de milímetros afectados por el tumor. A pesar de que dicha correlación no alcanzase un nivel de significación indiscutible, su bajo p-valor (0,071) sugiere que una ampliación de la muestra más allá de las 124 biopsias disponibles podría lograr suficiente poder estadístico para detectar una correlación significativa. Desafortunadamente, el porcentaje de milímetros afectados por el tumor no es un parámetro comúnmente estudiado en la bibliografía y, en consecuencia, no hemos podido contrastar nuestros hallazgos con resultados previos. Aun así, consideramos que el s-PCA3 potencialmente capta la agresividad tumoral reflejada por el porcentaje de milímetros afectados.

***s-PCA3 y porcentaje de cilindros afectados por tumor***

La relación entre el s-PCA3 y el porcentaje de cilindros afectados por tumor se ha estudiado utilizando dos estrategias diferentes: (i) un análisis de regresión (paramétrico/no paramétrico), tratando las variables como continuas, y (ii) un análisis de asociación (aplicando la prueba exacta de Fisher), tratando las variables como categóricas.

En el caso de la regresión, ninguno de los dos análisis mostró una correlación significativa entre s-PCA3 y el porcentaje de cilindros afectados. Como esta estrategia no es común en la bibliografía, no hemos podido contrastar nuestros resultados con otros ya existentes. En cambio, la prueba exacta de Fisher mostró una asociación estadísticamente significativa entre las dos variables. Estos

resultados coinciden con los reportados en metaanálisis y revisiones publicadas previamente (Hessels and Schalken 2009; Ruiz-Aragón and Márquez-Peláez 2010).

No se observó afectación en más del 33% de cilindros en ninguna de las biopsias de nuestra serie de pacientes que tenían un s-PCA3 entre 35 y 50. Esta tendencia se invierte en los pacientes con CaP y s-PCA3  $\geq$  50, y concuerda con resultados previamente reportados en un estudio europeo que involucró a más de 1000 pacientes (van Poppel, et al. 2012). Asimismo, otro estudio también reportó que el s-PCA3 fue significativamente mayor en los pacientes que tenían un porcentaje de cilindros afectados superior 33% (de la Taille, et al. 2011).

Estos datos indican que en los pacientes con diagnóstico de CaP con un s-PCA3 positivo inferior a 50 predominan notablemente los CaP de menor volumen tumoral y probablemente de menor grado, candidatos a manejo clínico conservador, pacientes, por otra parte, con riesgo de sobrediagnóstico y sobretratamiento con las estrategias de cribado clásicas.

### ***s-PCA y grado de Gleason***

Adicionalmente informamos, en nuestra población, sobre una asociación estadísticamente significativa entre el *PCA3* y el grado de Gleason. Dos de los estudios anteriormente mencionados (Hessels and Schalken 2009; Ruiz-Aragón and Márquez-Peláez 2010) también coinciden en esta observación. En el intervalo de s-PCA3 entre 35 y 50, un 77% de los CaP detectados tenían un grado de Gleason inferior a 7. Estas cifras se invierten en los pacientes con CaP y s-PCA3  $\geq$  50 y

concuerdan con los reportados previamente en el estudio europeo antes mencionado (van Poppel, et al. 2012).

En la bibliografía, el análisis de la relación del s-PCA3 con factores pronósticos establecidos, como el grado de Gleason, proporciona resultados contradictorios. En general no existe consenso sobre la relación del s-PCA3 con la agresividad tumoral (van Poppel, et al. 2012). En la mayoría de los estudios se considera que el s-PCA3 es negativo en pacientes con cáncer indolente (de la Taille, et al. 2011). Sin embargo, en los carcinomas clínicamente significativos no hay evidencias unánimes de una asociación del s-PCA3 positivo con el grado de Gleason; algunos estudios están a favor de esta hipótesis (Cornu, et al. 2013; de la Taille, et al. 2011; Ploussard, et al. 2011) y otros en contra (Auprich, et al. 2011; Hessels, et al. 2010; Leyten, et al. 2014).

En general, en base a la literatura, debe concluirse que la asociación entre el s-PCA3 y la agresividad del CaP requiere nuevos estudios.

El hallazgo de asociación estadísticamente significativa demostrada en este trabajo supone una nueva contribución que apoya la utilidad del s-PCA3 para evaluar la posible significación clínica de un CaP antes de efectuar la biopsia. El estudio de PCA3 puede facilitar, por tanto, la selección de la conducta clínica idónea para minimizar sobrediagnóstico y sobretratamiento

### 7.1.7 RELACIÓN ENTRE s-PCA3 Y DOS PARÁMETROS DE AGRESIVIDAD TUMORAL

El análisis de la relación del s-PCA3 con la agresividad tumoral basado en ternas de variables permite contrastar el efecto singular de cada variable con el efecto conjunto de las mismas a través de sus interacciones. En general, este tipo de análisis es poco habitual en la bibliografía y supone una aportación novedosa en el estudio del s-PCA3.

En la terna de variables que incluye el porcentaje de milímetros afectados (conjunto 1), el modelo log-lineal más parsimonioso es un poco menos complejo que el correspondiente al conjunto que incluye el porcentaje de cilindros afectados (conjunto 2). En concreto, en el modelo final del conjunto 1 hay dos términos de interacciones: (i) s-PCA3\*score de Gleason y (ii) % mm afectados\*score de Gleason. En cambio, en el modelo final del conjunto 2 hay tres tales términos: (i) s-PCA3\*% cilindros afectados, (ii) s-PCA3\*score de Gleason, y (iii) % cilindros afectados\*score de Gleason. Dada la similitud de los dos modelos, la conclusión es que existe interacción entre los parámetros estudiados, posiblemente debido a que el porcentaje de mm, el porcentaje de cilindros y el *score* de Gleason representan la agresividad tumoral.

Para la correcta interpretación global de los modelos, hay que tener en cuenta que el tamaño muestral (N = 46) no dispone de suficiente potencia estadística para un empleo robusto del modelo log-lineal. En otras palabras, los resultados no tienen el mismo poder estadístico que el test exacto de Fisher aplicado a una muestra pequeña. Aun así, el análisis log-lineal del s-PCA3 x Gleason x el porcentaje de

milímetros afectados (Tabla 13) es coherente con el análisis de regresión del Gleason vs. porcentaje de mm afectados (correlación significativa; datos no mostrados) y con el análisis de regresión del s-PCA3 vs. porcentaje de mm afectados (correlación no significativa; Tablas 4 y 5). Las mismas observaciones se pueden aplicar en el análisis log-lineal del s-PCA3 x Gleason x el porcentaje de cilindros afectados (Tablas 15 y 17).

### **7.1.8 IDONEIDAD DEL s-PCA3 EVALUADA POR EXPERTOS**

Dada la importancia del análisis del *PCA3* en el cribado de CaP, un estudio reciente exploró el valor del s-PCA3 en el contexto de la biopsia prostática (Tombal, et al. 2013). En este estudio novedoso, 12 urólogos evaluaron la idoneidad del *PCA3* en perfiles de pacientes teóricos, construidos mediante la combinación de variables clínicas. Cada uno de los expertos puntuó la idoneidad del *PCA3* en todos los perfiles, utilizando una escala de 9 puntos. El análisis del *PCA3* se consideró adecuado sobre todo en los pacientes con una o más biopsias negativas, PSA sérico  $\geq 3$  ng/ml y esperanza de vida  $\geq 10$  años. En los pacientes sin biopsia previa, una esperanza de vida  $\geq 10$  y un tacto rectal sospechoso, el análisis del *PCA3* no afectó la idoneidad de la biopsia. En otros pacientes, un s-PCA3  $< 20$  desaconsejó la biopsia, mientras que un valor  $\geq 35$  la apoyó. Estos resultados indican los grupos de pacientes en los que el análisis del *PCA3* puede aportar un valor adicional al tomar decisiones de biopsia y tratamiento en la práctica clínica.

## 7.2 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

A pesar de la concordancia general entre nuestras observaciones y las citadas en la bibliografía, este estudio presenta ciertas limitaciones tanto en la representatividad de la muestra como en el poder estadístico de la misma. A continuación, se comenta cada uno de estos sesgos.

### 7.2.1 LIMITACIONES EN LA REPRESENTATIVIDAD DE LA MUESTRA

Este trabajo, al ser un estudio observacional, se limita a analizar datos de pacientes que hayan acudido a la consulta del urólogo. Como la visita al urólogo probablemente esté asociada a la aparición de algún síntoma, cabe la posibilidad de que en nuestra muestra haya sobrerrepresentación de pacientes con patología prostática o alteraciones en los niveles de PSA y en la próstata a la vez. Dicho de otro modo, nuestra muestra no es producto de un muestreo aleatorio y la sobrerrepresentación de pacientes con patología podría generar una inflación en la estimación de las correlaciones y asociaciones estudiadas.

Otra posible fuente de sesgo es la realización de biopsias sólo en una parte de la muestra. Como es lógico, la serie de biopsias no se ha completado en los pacientes con s-PCA3 negativo, ya que no se estableció la indicación en el protocolo del estudio. Partimos de que múltiples estudios habían demostrado previamente una tasa de falsos negativos para el test de PCA3 suficientemente baja para su validación y aplicación clínica (Aubin, et al. 2010; de la Taille, et al. 2011; Gittelman, et al. 2013; Haese, et al. 2008; Hessels and Schalken 2009; Lee, et al. 2011) y comprobar este parámetro no formó parte de nuestros objetivos. La

biopsia sólo se indicó en pacientes con s-PCA3 positivo y, en el momento de cerrar nuestra serie, se habían recogido un total de 124 biopsias efectuadas dentro de nuestro protocolo de estudio, que suponen el 45,4 % de los pacientes con s-PCA3 positivo ( $\geq 35$ ). Los restantes pacientes se encuentran en seguimiento clínico en nuestro grupo, pendientes de programación de biopsia a criterio del urólogo. El s-PCA3 superior o igual a 35 no es el único criterio a considerar para indicar la biopsia. El contexto clínico influye y debe influir en esta decisión y, por supuesto, la decisión final la debe tomar el paciente después de recibir la información adecuada sobre los beneficios y problemas de la biopsia de próstata. Por otra parte, presumiblemente, una parte de los pacientes pueden haberse trasladado a otros centros y en estos casos carecemos de información actualizada sobre su seguimiento.

Por último, otra fuente de sesgo es la distribución geográfica de la muestra. Los pacientes estudiados provienen del área metropolitana de Barcelona. Como tal, cualquier conclusión tiene validez fundamentalmente en Barcelona y secundariamente en otras partes de España. La concordancia general entre nuestros hallazgos y aquellos provenientes de pacientes de la Comunidad Valenciana (Rubio-Briones, et al. 2014; Rubio-Briones, et al. 2011), puede justificar la extrapolación de conclusiones a un ámbito geográfico más amplio.

### **7.2.2 LIMITACIONES EN EL PODER ESTADISTICO DE LA MUESTRA**

Es probable que el número limitado de biopsias disponibles comprometa el poder estadístico de los análisis, sobre todo si se tiene en cuenta la división adicional de dichas biopsias en subgrupos. En concreto, de las 124 biopsias disponibles, 56

(45,2%) fueron diagnosticadas de CaP, 11 (8,8%) de ASAP, 10 (8,0%) de HGPIN y 47 (38,0%) de benignidad o normalidad. Ya hemos mencionado que el pequeño tamaño de la muestra podría ser la razón por la que la correlación entre el s-PCA3 y el porcentaje de milímetros afectados por carcinoma en la biopsia es sugestiva pero no claramente significativa, y también podríamos aplicar un argumento similar en el caso del análisis log-lineal.

De todos modos, independientemente de la importancia de la ampliación prospectiva del volumen de casos estudiados, los resultados disponibles indican claramente que el análisis del gen *PCA3* puede aportar nuevas vías de solución para la problemática que está generando el cribado del CaP con los recursos clínicos y bioquímicos clásicos, de especificidad y eficiencia subóptimas.

## **8 CONCLUSIONES**



1. La incorporación del estudio del gen PCA3 en orina post-masaje prostático es de utilidad en el manejo clínico de pacientes con sospecha de CaP.
2. El s-PCA3 incrementa la rentabilidad diagnóstica de la biopsia prostática.
3. En los pacientes con s-PCA3 positivo la incidencia de CaP en la biopsia de próstata es superior a la que se obtiene al indicarla únicamente con los parámetros clásicos.
4. El porcentaje de diagnóstico de malignidad en la biopsia se eleva proporcionalmente con las cifras de s-PCA3.
5. Un 57,2% de los pacientes con s-PCA3 superior a 100 presentan CaP en la biopsia.
6. Los resultados del estudio de PCA3 obtenidos en nuestra serie son concordantes con los de la literatura previa disponible y con un porcentaje muy reducido de muestras no valorables (1,8%), lo que contribuye a validar la metodología analítica y pre-analítica aplicada.
7. La incorporación del s-PCA3 en el panel de criterios de decisión clínica puede reducir la indicación de biopsia a menos del 45% de los casos.
8. El s-PCA3 no muestra relación con la edad del paciente.
9. El s-PCA3 no muestra relación con los niveles de PSA sérico ni con el índice de PSA.
10. El s-PCA3 en orina no muestra dependencia del volumen de la glándula prostática, a diferencia del PSA en suero.
11. El s-PCA3 no muestra relación con la presencia de prostatitis.

12. Existe relación estadísticamente significativa entre s-PCA3 y el grado de Gleason.
13. Existe relación estadísticamente significativa entre s-PCA3 y porcentaje de cilindros de la biopsia afectados por CaP, parámetro orientativo del volumen tumoral y estadío.
14. El estudio del gen PCA3 aporta criterios adicionales de utilidad para predecir la agresividad del CaP antes de efectuar la biopsia y seleccionar la conducta clínica idónea.
15. La incorporación del estudio del gen PCA3 puede ser útil para minimizar la problemática actual de sobrediagnóstico y sobretratamiento del CaP.

## **9 BIBLIOGRAFÍA**



- Abate-Shen, C. and M. M. Shen  
2000 Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 14(19):2410-2434.
- Aboushwareb, T. and A. Atala  
2008 Stem cells in urology. *Nat Clin Pract Urol* 5(11):621-631.
- Amundadottir, L. T., P. Sulem, J. Gudmundsson, A. Helgason, A. Baker, B. A. Agnarsson, A. Sigurdsson, K. R. Benediktsdottir, J. B. Cazier, J. Sainz, M. Jakobsdottir, J. Kostic, D. N. Magnusdottir, S. Ghosh, K. Agnarsson, B. Birgisdottir, L. Le Roux, A. Olafsdottir, T. Blondal, M. Andresdottir, O. S. Gretarsdottir, J. T. Bergthorsson, D. Gudbjartsson, A. Gylfason, G. Thorleifsson, A. Manolescu, K. Kristjansson, G. Geirsson, H. Isaksson, J. Douglas, J. E. Johansson, K. Balter, F. Wiklund, J. E. Montie, X. Yu, B. K. Suarez, C. Ober, K. A. Cooney, H. Gronberg, W. J. Catalona, G. V. Einarsson, R. B. Barkardottir, J. R. Gulcher, A. Kong, U. Thorsteinsdottir and K. Stefansson  
2006 A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nat Genet* 38(6):652-658.
- Andriole, G. L., E. D. Crawford, R. L. Grubb, 3rd, S. S. Buys, D. Chia, T. R. Church, M. N. Fouad, E. P. Gelmann, P. A. Kvale, D. J. Reding, J. L. Weissfeld, L. A. Yokochi, B. O'Brien, J. D. Clapp, J. M. Rathmell, T. L. Riley, R. B. Hayes, B. S. Kramer, G. Izmirlian, A. B. Miller, P. F. Pinsky, P. C. Prorok, J. K. Gohagan, C. D. Berg and Plco Project Team  
2009 Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* 360(13):1310-1319.
- Aubin, S. M., J. Reid, M. J. Sarno, A. Blase, J. Aussie, H. Rittenhouse, R. Rittmaster, G. L. Andriole and J. Groskopf  
2010 PCA3 molecular urine test for predicting repeat prostate biopsy outcome in populations at risk: validation in the placebo arm of the dutasteride REDUCE trial. *J Urol* 184(5):1947-1952.
- Auprich, M., F. K. Chun, J. F. Ward, K. Pummer, R. Babaian, H. Augustin, F. Luger, S. Gutsch, L. Budaus, M. Fisch, H. Huland, M. Graefen and A. Haese  
2011 Critical assessment of preoperative urinary prostate cancer antigen 3 on the accuracy of prostate cancer staging. *Eur Urol* 59(1):96-105.
- Aus, G., J. E. Damber, A. Khatami, H. Lilja, J. Stranne and J. Hugosson  
2005 Individualized screening interval for prostate cancer based on prostate-specific antigen level: results of a prospective, randomized, population-based study. *Arch Intern Med* 165(16):1857-1861.
- Barry, M. J.  
2009 Screening for prostate cancer--the controversy that refuses to die. *N Engl J Med* 360(13):1351-1354.
- Basch, E., T. K. Oliver, A. Vickers, I. Thompson, P. Kantoff, H. Parnes, D. A. Loblaw, B. Roth, J. Williams and R. K. Nam  
2012 Screening for prostate cancer with prostate-specific antigen testing: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion. *J Clin Oncol* 30(24):3020-3025.

- Baumann, C. and T. E. Behbahani  
2012 [EAU guidelines for prostate cancer: to screen or not to screen?]. *Actas Urol Esp* 36(1):1.
- Bostwick, D. G., H. B. Burke, D. Djakiew, S. Euling, S. M. Ho, J. Landolph, H. Morrison, B. Sonawane, T. Shifflett, D. J. Waters and B. Timms  
2004 Human prostate cancer risk factors. *Cancer* 101(10 Suppl):2371-2490.
- Bostwick, D. G., A. Shan, J. Qian, M. Darson, N. J. Maihle, R. B. Jenkins and L. Cheng  
1998 Independent origin of multiple foci of prostatic intraepithelial neoplasia: comparison with matched foci of prostate carcinoma. *Cancer* 83(9):1995-2002.
- Bratt, O.  
2002 Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol* 168(3):906-913.
- Brennick, J. B., J. X. O'Connell, G. R. Dickersin, B. Z. Pilch and R. H. Young  
1994 Lipofuscin pigmentation (so-called "melanosis") of the prostate. *Am J Surg Pathol* 18(5):446-454.
- Brett, A. S. and R. J. Ablin  
2011 Prostate-cancer screening--what the U.S. Preventive Services Task Force left out. *N Engl J Med* 365(21):1949-1951.
- Bussemakers, M. J., A. van Bokhoven, G. W. Verhaegh, F. P. Smit, H. F. Karthaus, J. A. Schalken, F. M. Debruyne, N. Ru and W. B. Isaacs  
1999 DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 59(23):5975-5979.
- Carlsson, S., A. J. Vickers, M. Roobol, J. Eastham, P. Scardino, H. Lilja and J. Hugosson  
2012 Prostate cancer screening: facts, statistics, and interpretation in response to the US Preventive Services Task Force Review. *J Clin Oncol* 30(21):2581-2584.
- Carter, H. B., P. C. Albertsen, M. J. Barry, R. Etzioni, S. J. Freedland, K. L. Greene, L. Holmberg, P. Kantoff, B. R. Konety, M. H. Murad, D. F. Penson and A. L. Zietman  
2013 Early detection of prostate cancer: AUA Guideline. *J Urol* 190(2):419-426.
- Catalona, W. J., A. W. Partin, K. M. Slawin, M. K. Brawer, R. C. Flanigan, A. Patel, J. P. Richie, J. B. deKernion, P. C. Walsh, P. T. Scardino, P. H. Lange, E. N. Subong, R. E. Parson, G. H. Gasior, K. G. Loveland and P. C. Southwick  
1998 Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA* 279(19):1542-1547.
- Catalona, W. J., J. P. Richie, J. B. deKernion, F. R. Ahmann, T. L. Ratliff, B. L. Dalkin, L. R. Kavoussi, M. T. MacFarlane and P. C. Southwick

- 1994 Comparison of prostate specific antigen concentration versus prostate specific antigen density in the early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves. *J Urol* 152(6 Pt 1):2031-2036.
- Catalona, W. J., D. S. Smith and D. K. Ornstein  
1997 Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/mL and benign prostate examination. Enhancement of specificity with free PSA measurements. *JAMA* 277(18):1452-1455.
- Cornu, J. N., G. Cancel-Tassin, C. Egrot, C. Gaffory, F. Haab and O. Cussenot  
2013 Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript integrated with PCA3 score, genotyping, and biological features are correlated to the results of prostatic biopsies in men at risk of prostate cancer. *Prostate* 73(3):242-249.
- Costello, L. C. and R. B. Franklin  
2006 The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. *Mol Cancer* 5:17.
- Coussens, L. M. and Z. Werb  
2002 Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917):860-867.
- Crawford, E. D., K. O. Rove, E. J. Trabulsi, J. Qian, K. P. Drewnowska, J. C. Kaminetsky, T. K. Huisman, M. L. Bilowus, S. J. Freedman, W. L. Glover, Jr. and D. G. Bostwick  
2012 Diagnostic performance of PCA3 to detect prostate cancer in men with increased prostate specific antigen: a prospective study of 1,962 cases. *J Urol* 188(5):1726-1731.
- Chen, Z., L. C. Trotman, D. Shaffer, H. K. Lin, Z. A. Dotan, M. Niki, J. A. Koutcher, H. I. Scher, T. Ludwig, W. Gerald, C. Cordon-Cardo and P. P. Pandolfi  
2005 Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436(7051):725-730.
- Day, J. R., M. Jost, M. A. Reynolds, J. Groskopf and H. Rittenhouse  
2011 PCA3: from basic molecular science to the clinical lab. *Cancer Lett* 301(1):1-6.
- de la Taille, A., J. Irani, M. Graefen, F. Chun, T. de Reijke, P. Kil, P. Gontero, A. Mottaz and A. Haese  
2011 Clinical evaluation of the PCA3 assay in guiding initial biopsy decisions. *J Urol* 185(6):2119-2125.
- De Luca, S., R. Passera, A. Milillo, R. Coda and D. F. Randone  
2012 Histological chronic prostatitis and high-grade prostate intra-epithelial neoplasia do not influence urinary prostate cancer gene 3 score. *BJU Int*.
- Dennis, L. K. and D. V. Dawson  
2002 Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer. *Epidemiology* 13(1):72-79.

- Dennis, L. K., C. F. Lynch and J. C. Torner  
2002 Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology* 60(1):78-83.
- Draisma, G., R. Etzioni, A. Tsodikov, A. Mariotto, E. Wever, R. Gulati, E. Feuer and H. de Koning  
2009 Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context. *J Natl Cancer Inst* 101(6):374-383.
- Eeles, R. A., D. P. Dearnaley, A. Ardern-Jones, R. J. Shearer, D. F. Easton, D. Ford, S. Edwards and A. Dowe  
1997 Familial prostate cancer: the evidence and the Cancer Research Campaign/British Prostate Group (CRC/BPG) UK Familial Prostate Cancer Study. *Br J Urol* 79 Suppl 1:8-14.
- Ellinger, J., P. J. Bastian, T. Jurgan, K. Biermann, P. Kahl, L. C. Heukamp, N. Wernert, S. C. Muller and A. von Ruecker  
2008 CpG island hypermethylation at multiple gene sites in diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Urology* 71(1):161-167.
- Epstein, J. I., W. C. Allsbrook, Jr., M. B. Amin, L. L. Egevad and Isup Grading Committee  
2005 The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 29(9):1228-1242.
- Esserman, L., Y. Shieh and I. Thompson  
2009 Rethinking screening for breast cancer and prostate cancer. *JAMA* 302(15):1685-1692.
- Etzioni, R., R. Gulati, L. Mallinger and J. Mandelblatt  
2013 Influence of study features and methods on overdiagnosis estimates in breast and prostate cancer screening. *Ann Intern Med* 158(11):831-838.
- Fang, J., E. J. Metter, P. Landis and H. B. Carter  
2002 PSA velocity for assessing prostate cancer risk in men with PSA levels between 2.0 and 4.0 ng/ml. *Urology* 59(6):889-893; discussion 893-884.
- Farwell, W. R., J. A. Linder and A. K. Jha  
2007 Trends in prostate-specific antigen testing from 1995 through 2004. *Arch Intern Med* 167(22):2497-2502.
- Ferlay, J., D. M. Parkin and E. Steliarova-Foucher  
2010 Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 46(4):765-781.
- Fernandez-Serra, A., J. Rubio-Briones, Z. Garcia-Casado, E. Solsona and J. A. Lopez-Guerrero  
2011 [Prostate cancer: the revolution of the fusion genes]. *Actas Urol Esp* 35(7):420-428.

- 
- Ferreira, L. B., A. Palumbo, K. D. de Mello, C. Sternberg, M. S. Caetano, F. L. de Oliveira, A. F. Neves, L. E. Nasciutti, L. R. Goulart and E. R. Gimba  
2012 PCA3 noncoding RNA is involved in the control of prostate-cancer cell survival and modulates androgen receptor signaling. *BMC Cancer* 12:507.
- Ferris-i-Tortajada, J., J. Garcia-i-Castell, O. Berbel-Tornero and J. A. Ortega-Garcia  
2011 [Constitutional risk factors in prostate cancer]. *Actas Urol Esp* 35(5):282-288.
- Filella, X., J. Alcover, R. Molina, P. Luque, J. M. Corral, J. M. Auge and F. Coca  
2007 Usefulness of proprostate-specific antigen in the diagnosis of prostate cancer. *Anticancer Res* 27(1B):607-610.
- Force, U. S. Preventive Services Task  
2002 Screening for prostate cancer: recommendation and rationale. *Ann Intern Med* 137(11):915-916.
- 2008 Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 149(3):185-191.
- Fournier, G., A. Valeri, P. Mangin and O. Cussenot  
2004 [Prostate cancer. Epidemiology. Risk factors. Pathology]. *Ann Urol (Paris)* 38(5):187-206.
- Friendly, Michael  
Working with categorical data with R and the vcd and vcdExtra packages.
- Giles, G. G., G. Severi, D. R. English, M. R. McCredie, R. Borland, P. Boyle and J. L. Hopper  
2003 Sexual factors and prostate cancer. *BJU Int* 92(3):211-216.
- Gillanders, E. M., J. Xu, B. L. Chang, E. M. Lange, F. Wiklund, J. E. Bailey-Wilson, A. Baffoe-Bonnie, M. Jones, D. Gildea, E. Riedesel, J. Albertus, S. D. Isaacs, K. E. Wiley, C. E. Mohai, M. P. Matikainen, T. L. Tammela, S. L. Zheng, W. M. Brown, A. Rokman, J. D. Carpten, D. A. Meyers, P. C. Walsh, J. Schleutker, H. Gronberg, K. A. Cooney, W. B. Isaacs and J. M. Trent  
2004 Combined genome-wide scan for prostate cancer susceptibility genes. *J Natl Cancer Inst* 96(16):1240-1247.
- Gittelman, M. C., B. Hertzman, J. Bailen, T. Williams, I. Koziol, R. J. Henderson, M. Efros, M. Bidair and J. F. Ward  
2013 PCA3 molecular urine test as a predictor of repeat prostate biopsy outcome in men with previous negative biopsies: a prospective multicenter clinical study. *J Urol* 190(1):64-69.
- Gleason, D. F.  
1966 Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 50(3):125-128.
- Gleason, D. F. and G. T. Mellinger  
1974 Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 111(1):58-64.
-

- Groskopf, J., S. M. Aubin, I. L. Deras, A. Blase, S. Bodrug, C. Clark, S. Brentano, J. Mathis, J. Pham, T. Meyer, M. Cass, P. Hodge, M. L. Macairan, L. S. Marks and H. Rittenhouse  
2006 APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem* 52(6):1089-1095.
- Gulati, R., L. Y. Inoue, J. L. Gore, J. Katcher and R. Etzioni  
2014 Individualized estimates of overdiagnosis in screen-detected prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 106(2):djt367.
- Haese, A., A. de la Taille, H. van Poppel, M. Marberger, A. Stenzl, P. F. Mulders, H. Huland, C. C. Abbou, M. Remzi, M. Tinzl, S. Feyerabend, A. B. Stillebroer, M. P. van Gils and J. A. Schalken  
2008 Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur Urol* 54(5):1081-1088.
- Haggman, M. J., J. A. Macoska, K. J. Wojno and J. E. Oesterling  
1997 The relationship between prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer: critical issues. *J Urol* 158(1):12-22.
- Haiman, C. A., G. K. Chen, W. J. Blot, S. S. Strom, S. I. Berndt, R. A. Kittles, B. A. Rybicki, W. B. Isaacs, S. A. Ingles, J. L. Stanford, W. R. Diver, J. S. Witte, A. W. Hsing, B. Nemesure, T. R. Rebbeck, K. A. Cooney, J. Xu, A. S. Kibel, J. J. Hu, E. M. John, S. M. Gueye, S. Watya, L. B. Signorello, R. B. Hayes, Z. Wang, E. Yeboah, Y. Tettey, Q. Cai, S. Kolb, E. A. Ostrander, C. Zeigler-Johnson, Y. Yamamura, C. Neslund-Dudas, J. Haslag-Minoff, W. Wu, V. Thomas, G. O. Allen, A. Murphy, B. L. Chang, S. L. Zheng, M. C. Leske, S. Y. Wu, A. M. Ray, A. J. Hennis, M. J. Thun, J. Carpten, G. Casey, E. N. Carter, E. R. Duarte, L. Y. Xia, X. Sheng, P. Wan, L. C. Pooler, I. Cheng, K. R. Monroe, F. Schumacher, L. Le Marchand, L. N. Kolonel, S. J. Chanock, D. Van Den Berg, D. O. Stram and B. E. Henderson  
2011 Genome-wide association study of prostate cancer in men of African ancestry identifies a susceptibility locus at 17q21. *Nat Genet* 43(6):570-573.
- Hansen, J., M. Auprich, S. A. Ahyai, A. de la Taille, H. van Poppel, M. Marberger, A. Stenzl, P. F. Mulders, H. Huland, M. Fisch, C. C. Abbou, J. A. Schalken, Y. Fradet, L. S. Marks, W. Ellis, A. W. Partin, K. Pummer, M. Graefen, A. Haese, J. Walz, A. Briganti, S. F. Shariat and F. K. Chun  
2013 Initial prostate biopsy: development and internal validation of a biopsy-specific nomogram based on the prostate cancer antigen 3 assay. *Eur Urol* 63(2):201-209.
- Heidenreich, A, M Bolla, S Joniau, MD Mason, V Matveev, N Mottet and HP Schmid  
2010 Guía clínica sobre el cáncer de próstata.
- Hessels, D. and J. A. Schalken  
2009 The use of PCA3 in the diagnosis of prostate cancer. *Nat Rev Urol* 6(5):255-261.
- Hessels, D., M. P. van Gils, O. van Hooij, S. A. Jannink, J. A. Witjes, G. W. Verhaegh and J. A. Schalken  
2010 Predictive value of PCA3 in urinary sediments in determining clinico-pathological characteristics of prostate cancer. *Prostate* 70(1):10-16.

- Hoffman, R. M.  
2011 Clinical practice. Screening for prostate cancer. *N Engl J Med* 365(21):2013-2019.
- Horwich, A., J. Hugosson, T. de Reijke, T. Wiegel, K. Fizazi, V. Kataja, Members Panel and Oncology European Society for Medical  
2013 Prostate cancer: ESMO Consensus Conference Guidelines 2012. *Ann Oncol* 24(5):1141-1162.
- Hsing, A. W.  
2001 Hormones and prostate cancer: what's next? *Epidemiol Rev* 23(1):42-58.
- Klein, E. A. and R. Silverman  
2008 Inflammation, infection, and prostate cancer. *Curr Opin Urol* 18(3):315-319.
- Lee, G. L., A. Dobi and S. Srivastava  
2011 Prostate cancer: diagnostic performance of the PCA3 urine test. *Nat Rev Urol* 8(3):123-124.
- Leyten, G. H., D. Hessels, S. A. Jannink, F. P. Smit, H. de Jong, E. B. Cornel, T. M. de Reijke, H. Vergunst, P. Kil, B. C. Knipscheer, I. M. van Oort, P. F. Mulders, C. A. Hulsbergen-van de Kaa and J. A. Schalken  
2014 Prospective multicentre evaluation of PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic and prognostic urinary biomarkers for prostate cancer. *Eur Urol* 65(3):534-542.
- Lipsky, B. A.  
1999 Prostatitis and urinary tract infection in men: what's new; what's true? *Am J Med* 106(3):327-334.
- Lujan, M., A. Paez, J. C. Angulo, R. Granados, M. Nevado, G. M. Torres and A. Berenguer  
2014 Prostate cancer incidence and mortality in the Spanish section of the European Randomized Study of Screening For Prostate Cancer (ERSPC). *Prostate Cancer Prostatic Dis.*
- Lujan, M., A. Paez, A. Berenguer and J. A. Rodriguez  
2012 [Mortality due to prostate cancer in the Spanish arm of the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC). Results after a 15-year follow-up]. *Actas Urol Esp* 36(7):403-409.
- Marks, L. S., Y. Fradet, I. L. Deras, A. Blase, J. Mathis, S. M. Aubin, A. T. Cancio, M. Desaulniers, W. J. Ellis, H. Rittenhouse and J. Groskopf  
2007 PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology* 69(3):532-535.
- McConnell, J. D., C. G. Roehrborn, O. M. Bautista, G. L. Andriole, Jr., C. M. Dixon, J. W. Kusek, H. Lepor, K. T. McVary, L. M. Nyberg, Jr., H. S. Clarke, E. D. Crawford, A. Diokno, J. P. Foley, H. E. Foster, S. C. Jacobs, S. A. Kaplan, K. J. Kreder, M. M. Lieber, M. S. Lucia, G. J. Miller, M. Menon,

- D. F. Milam, J. W. Ramsdell, N. S. Schenkman, K. M. Slawin, J. A. Smith and Group Medical Therapy of Prostatic Symptoms Research  
2003 The long-term effect of doxazosin, finasteride, and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia. *N Engl J Med* 349(25):2387-2398.
- McNeal, J. E.  
1981 Normal and pathologic anatomy of prostate. *Urology* 17(Suppl 3):11-16.
- Mellinger, G. T.  
1977 Prognosis of prostatic carcinoma. *Recent Results Cancer Res* (60):61-72.
- Merson, S., Z. H. Yang, D. Brewer, D. Olmos, A. Eichholz, F. McCarthy, G. Fisher, G. Kovacs, D. M. Berney, C. S. Foster, H. Moller, P. Scardino, J. Cuzick, C. S. Cooper and J. P. Clark  
2014 Focal amplification of the androgen receptor gene in hormone-naive human prostate cancer. *Br J Cancer* 110(6):1655-1662.
- Merson, S., Z. H. Yang, D. Brewer, D. Olmos, A. Eichholz, F. McCarthy, G. Fisher, G. Kovacs, D. M. Berney, C. S. Foster, H. Moller, P. Scardino, J. Cuzick, C. S. Cooper, J. P. Clark and Group Transatlantic Prostate  
2014 Focal amplification of the androgen receptor gene in hormone-naive human prostate cancer. *Br J Cancer* 110(6):1655-1662.
- Miller, D. C., K. S. Hafez, A. Stewart, J. E. Montie and J. T. Wei  
2003 Prostate carcinoma presentation, diagnosis, and staging: an update from the National Cancer Data Base. *Cancer* 98(6):1169-1178.
- Montironi, R., L. Cheng, A. Lopez-Beltran, M. Scarpelli, R. Mazzucchelli, G. Mikuz, Z. Kirkali and F. Montorsi  
2010 Original Gleason system versus 2005 ISUP modified Gleason system: the importance of indicating which system is used in the patient's pathology and clinical reports. *Eur Urol* 58(3):369-373.
- Montironi, R., R. Mazzucchelli, F. Algaba and A. Lopez-Beltran  
2000 Morphological identification of the patterns of prostatic intraepithelial neoplasia and their importance. *J Clin Pathol* 53(9):655-665.
- Montironi, R., R. Mazzucchelli, A. Lopez-Beltran, L. Cheng and M. Scarpelli  
2007 Mechanisms of disease: high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and other proposed preneoplastic lesions in the prostate. *Nat Clin Pract Urol* 4(6):321-332.
- Montironi, R., V. Scattoni, R. Mazzucchelli, A. Lopez-Beltran, D. G. Bostwick and F. Montorsi  
2006 Atypical foci suspicious but not diagnostic of malignancy in prostate needle biopsies (also referred to as "atypical small acinar proliferation suspicious for but not diagnostic of malignancy"). *Eur Urol* 50(4):666-674.
- Moyer, V. A. and U. S. Preventive Services Task Force  
2012 Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 157(2):120-134.

---

2014 Screening for lung cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 160(5):330-338.

Narizhneva, N. V., N. D. Tararova, P. Ryabokon, I. Shyshynova, A. Prokvolit, P. G. Komarov, A. A. Purmal, A. V. Gudkov and K. V. Gurova

2009 Small molecule screening reveals a transcription-independent pro-survival function of androgen receptor in castration-resistant prostate cancer. *Cell Cycle* 8(24):4155-4167.

Netter, Frank H.

2011 *Atlas de Anatomía Humana*. 5ª ed.

Olumi, A. F.

2014 Commentary on "identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array." Eeles RA, Olama AA, Benlloch S, Saunders EJ, Leongamornlert DA, Tymrakiewicz M, Ghousaini M, Luccarini C, Dennis J, Jugurnauth-Little S, Dadaev T, Neal DE, Hamdy FC, Donovan JL, Muir K, Giles GG, Severi G, Wiklund F, Gronberg H, Haiman CA, Schumacher F, Henderson BE, Le Marchand L, Lindstrom S, Kraft P, Hunter DJ, Gapstur S, Chanock SJ, Berndt SI, Albanes D, Andriole G, Schleutker J, Weischer M, Canzian F, Riboli E, Key TJ, Travis RC, Campa D, Ingles SA, John EM, Hayes RB, Pharoah PD, Pashayan N, Khaw KT, Stanford JL, Ostrander EA, Signorello LB, Thibodeau SN, Schaid D, Maier C, Vogel W, Kibel AS, Cybulski C, Lubinski J, Cannon-Albright L, Brenner H, Park JY, Kaneva R, Batra J, Spurdle AB, Clements JA, Teixeira MR, Dicks E, Lee A, Dunning AM, Baynes C, Conroy D, Maranian MJ, Ahmed S, Govindasami K, Guy M, Wilkinson RA, Sawyer EJ, Morgan A, Dearnaley DP, Horwich A, Huddart RA, Khoo VS, Parker CC, Van As NJ, Woodhouse CJ, Thompson A, Dudderidge T, Ogden C, Cooper CS, Lophatananon A, Cox A, Southey MC, Hopper JL, English DR, Aly M, Adolfsson J, Xu J, Zheng SL, Yeager M, Kaaks R, Diver WR, Gaudet MM, Stern MC, Corral R, Joshi AD, Shahabi A, Wahlfors T, Tammela TL, Auvinen A, Virtamo J, Klarskov P, Nordestgaard BG, Roder MA, Nielsen SF, Bojesen SE, Siddiq A, Fitzgerald LM, Kolb S, Kwon EM, Karyadi DM, Blot WJ, Zheng W, Cai Q, McDonnell SK, Rinckleb AE, Drake B, Colditz G, Wokolorczyk D, Stephenson RA, Teerlink C, Muller H, Rothenbacher D, Sellers TA, Lin HY, Slavov C, Mitev V, Lose F, Srinivasan S, Maia S, Paulo P, Lange E, Cooney KA, Antoniou AC, Vincent D, Bacot F, Tessier DC; COGS-Cancer Research UK GWAS-ELLIPSE (part of GAME-ON) Initiative; Australian Prostate Cancer Bioresource; UK Genetic Prostate Cancer Study Collaborators/British Association of Urological Surgeons' Section of Oncology; UK ProtecT (Prostate testing for cancer and Treatment) Study. *Urol Oncol* 32(2):211.

Patel, A. R. and E. A. Klein

2009 Risk factors for prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol* 6(2):87-95.

Petrovics, G., A. Liu, S. Shaheduzzaman, B. Furusato, C. Sun, Y. Chen, M. Nau, L. Ravindranath, Y. Chen, A. Dobi, V. Srikantan, I. A. Sesterhenn, D. G. McLeod, M. Vahey, J. W. Moul and S. Srivastava

2005 Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene* 24(23):3847-3852.

- Placer, J. and J. Morote  
2011 [Usefulness of prostatic specific antigen (PSA) for diagnosis and staging of patients with prostate cancer]. *Arch Esp Urol* 64(8):659-680.
- Platz, E. A. and A. M. De Marzo  
2004 Epidemiology of inflammation and prostate cancer. *J Urol* 171(2 Pt 2):S36-40.
- Ploussard, G. and A. de la Taille  
2010 Urine biomarkers in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 7(2):101-109.
- Ploussard, G., X. Durand, E. Xylinas, S. Moutereau, C. Radulescu, A. Forgue, N. Nicolaiew, S. Terry, Y. Allory, S. Loric, L. Salomon, F. Vacherot and A. de la Taille  
2011 Prostate cancer antigen 3 score accurately predicts tumour volume and might help in selecting prostate cancer patients for active surveillance. *Eur Urol* 59(3):422-429.
- Ploussard, G., A. Haese, H. Van Poppel, M. Marberger, A. Stenzl, P. F. Mulders, H. Huland, L. Bastien, C. C. Abbou, M. Remzi, M. Tinzl, S. Feyerabend, A. B. Stillebroer, M. P. Van Gils, J. A. Schalken and A. de La Taille  
2010 The prostate cancer gene 3 (PCA3) urine test in men with previous negative biopsies: does free-to-total prostate-specific antigen ratio influence the performance of the PCA3 score in predicting positive biopsies? *BJU Int* 106(8):1143-1147.
- Popa, I., Y. Fradet, G. Beaudry, H. Hovington, G. Beaudry and B. Tetu  
2007 Identification of PCA3 (DD3) in prostatic carcinoma by in situ hybridization. *Mod Pathol* 20(11):1121-1127.
- Potter, S. R., J. I. Epstein and A. W. Partin  
2000 Seminal vesicle invasion by prostate cancer: prognostic significance and therapeutic implications. *Rev Urol* 2(3):190-195.
- Quinn, M. and P. Babb  
2002 Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part II: individual countries. *BJU Int* 90(2):174-184.
- Ramsey, E. W.  
2000 Benign prostatic hyperplasia: a review. *Can J Urol* 7(6):1135-1143.
- RDevelopment, CORE  
*TEAM: R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011. ISBN 3-900051-07-0.*
- Remzi, M., Y. K. Fong, M. Dobrovits, T. Anagnostou, C. Seitz, M. Waldert, M. Harik, S. Marihart, M. Marberger and B. Djavan  
2005 The Vienna nomogram: validation of a novel biopsy strategy defining the optimal number of cores based on patient age and total prostate volume. *J Urol* 174(4 Pt 1):1256-1260; discussion 1260-1251; author reply 1261.

---

Ribeiro da Silva, M. N., M. Tobias-Machado, A. C. Lima-Pompeo, L. O. Reis and M. A. da Silva Pinhal

2012 [Prostate cancer: promising biomarkers related to aggressive disease]. *Actas Urol Esp* 36(8):484-490.

Roobol, M. J., F. H. Schroder, P. van Leeuwen, T. Wolters, R. C. van den Bergh, G. J. van Leenders and D. Hessels

2010 Performance of the prostate cancer antigen 3 (PCA3) gene and prostate-specific antigen in prescreened men: exploring the value of PCA3 for a first-line diagnostic test. *Eur Urol* 58(4):475-481.

Rubio-Briones, J., J. Casanova, R. Dumont, L. Rubio, A. Fernandez-Serra, I. Casanova-Salas, J. Dominguez-Escrig, M. Ramirez-Backhaus, A. Collado, A. Gomez-Ferrer, I. Iborra, J. L. Monros, J. V. Ricos, E. Solsona, D. Salas, F. Martinez and J. A. Lopez-Guerrero

2014 Optimizing prostate cancer screening; prospective randomized controlled study of the role of PSA and PCA3 testing in a sequential manner in an opportunistic screening program. *Actas Urol Esp* 38(4):217-223.

Rubio-Briones, J., A. Fernandez-Serra, M. Ramirez, L. Rubio, A. Collado, J. Casanova, A. Gomez-Ferrer, J. V. Ricos, J. L. Monros, R. Dumont, B. Ortiz, I. Iborra, Z. Garcia-Casado, E. Solsona and J. A. Lopez-Guerrero

2011 [Outcomes of expanded use of PCA3 testing in a Spanish population with clinical suspicion of prostate cancer]. *Actas Urol Esp* 35(10):589-596.

Ruiz-Aragón, J and S Márquez-Peláez

2010 Evaluación del test PCA3 para el diagnóstico de cáncer de próstata: revisión sistemática y metanálisis. *Actas Urológicas Españolas* 34(4):346-355.

Ryu, J. H., Y. B. Kim, J. K. Lee, Y. J. Kim and T. Y. Jung

2010 Predictive factors of prostate cancer at repeat biopsy in patients with an initial diagnosis of atypical small acinar proliferation of the prostate. *Korean J Urol* 51(11):752-756.

Salami, S. S., F. Schmidt, B. Laxman, M. M. Regan, D. S. Rickman, D. Scherr, G. Bueti, J. Siddiqui, S. A. Tomlins, J. T. Wei, A. M. Chinnaiyan, M. A. Rubin and M. G. Sanda

2013 Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. *Urol Oncol* 31(5):566-571.

Sandblom, G., E. Varenhorst, J. Rosell, O. Lofman and P. Carlsson

2011 Randomised prostate cancer screening trial: 20 year follow-up. *BMJ* 342:d1539.

Schroder, F. H., J. Hugosson, M. J. Roobol, T. L. Tammela, S. Ciatto, V. Nelen, M. Kwiatkowski, M. Lujan, H. Lilja, M. Zappa, L. J. Denis, F. Recker, A. Berenguer, L. Maattanen, C. H. Bangma, G. Aus, A. Villers, X. Rebillard, T. van der Kwast, B. G. Blijenberg, S. M. Moss, H. J. de Koning and A. Auvinen

- 2009 Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* 360(13):1320-1328.
- Schroder, F. H., J. Hugosson, M. J. Roobol, T. L. Tammela, S. Ciatto, V. Nelen, M. Kwiatkowski, M. Lujan, H. Lilja, M. Zappa, L. J. Denis, F. Recker, A. Paez, L. Maattanen, C. H. Bangma, G. Aus, S. Carlsson, A. Villers, X. Rebillard, T. van der Kwast, P. M. Kujala, B. G. Blijenberg, U. H. Stenman, A. Huber, K. Taari, M. Hakama, S. M. Moss, H. J. de Koning, A. Auvinen and Erspc Investigators  
2012 Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. *N Engl J Med* 366(11):981-990.
- Senapati, S., S. Rachagani, K. Chaudhary, S. L. Johansson, R. K. Singh and S. K. Batra  
2010 Overexpression of macrophage inhibitory cytokine-1 induces metastasis of human prostate cancer cells through the FAK-RhoA signaling pathway. *Oncogene* 29(9):1293-1302.
- Shariat, S. F., D. S. Scherr, A. Gupta, F. J. Bianco, Jr., P. I. Karakiewicz, I. S. Zeltser, D. B. Samadi and A. Akhavan  
2011 Emerging biomarkers for prostate cancer diagnosis, staging, and prognosis. *Arch Esp Urol* 64(8):681-694.
- Siegel, R., D. Naishadham and A. Jemal  
2012 Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62(1):10-29.
- Stephenson, A. J., M. W. Kattan, J. A. Eastham, F. J. Bianco, Jr., O. Yossepowitch, A. J. Vickers, E. A. Klein, D. P. Wood and P. T. Scardino  
2009 Prostate cancer-specific mortality after radical prostatectomy for patients treated in the prostate-specific antigen era. *J Clin Oncol* 27(26):4300-4305.
- Tombal, B., G. L. Andriole, A. de la Taille, P. Gontero, A. Haese, M. Remzi, M. Speakman, L. Smets and H. Stoevelaar  
2013 Clinical judgment versus biomarker prostate cancer gene 3: which is best when determining the need for repeat prostate biopsy? *Urology* 81(5):998-1004.
- Tran, C. P., C. Lin, J. Yamashiro and R. E. Reiter  
2002 Prostate stem cell antigen is a marker of late intermediate prostate epithelial cells. *Mol Cancer Res* 1(2):113-121.
- Uemura, H., K. Hoshino, T. Sasaki, Y. Miyoshi, H. Ishiguro, Y. Inayama and Y. Kubota  
2009 Usefulness of the 2005 International Society of Urologic Pathology Gleason grading system in prostate biopsy and radical prostatectomy specimens. *BJU Int* 103(9):1190-1194.
- Van der Kwast, T. H., A. Evans, G. Lockwood, D. Tkachuk, D. G. Bostwick, J. I. Epstein, P. A. Humphrey, R. Montironi, G. J. Van Leenders, C. G. Pihl, I. Neetens, P. M. Kujala, M. Laurila, C. Mazerolles, L. Bubendorf, A. Finelli, K. Watson and J. Srigley  
2010 Variability in diagnostic opinion among pathologists for single small atypical foci in prostate biopsies. *Am J Surg Pathol* 34(2):169-177.

---

van Poppel, H., A. Haese, M. Graefen, A. de la Taille, J. Irani, T. de Reijke, M. Remzi and M. Marberger

2012 The relationship between Prostate CAncer gene 3 (PCA3) and prostate cancer significance. *BJU Int* 109(3):360-366.

Verdu, M., I. Trias, R. Roman, N. Rodon, B. Garcia-Pelaez, M. Calvo, A. Dominguez, J. M. Banus and X. Puig

2013 ERG expression and prostatic adenocarcinoma. *Virchows Arch* 462(6):639-644.

Verhaegh, G. W., A. van Bokhoven, F. Smit, J. A. Schalken and M. J. Bussemakers

2000 Isolation and characterization of the promoter of the human prostate cancer-specific DD3 gene. *J Biol Chem* 275(48):37496-37503.

Vinay Kumar, Abul K. Abbas and Nelson Fausto

2005 *Patología estructural y funcional*.

Vinet, M., V. Vlaeminck-Guillem, O. Rouviere, P. Perrin, P. Paparel, M. Devonec, E. Adam, P. E. Briant and A. Ruffion

2013 [Does PCA3 score and prostatic MRI help selection of patients scheduled for initial prostatic biopsy?]. *Prog Urol* 23(2):121-127.

Vlaeminck-Guillem, V., M. Bandel, M. Cottancin, C. Rodriguez-Lafrasse, J. M. Bohbot and P. Sednaoui

2012 Chronic prostatitis does not influence urinary PCA3 score. *Prostate* 72(5):549-554.

Watanabe, S., Y. Miyata, S. Kanda, T. Iwata, T. Hayashi, H. Kanetake and H. Sakai

2010 Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in human prostate cancer specimens with and without neo-adjuvant hormonal therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 136(5):787-793.

WHO

2014 *World Cancer Report 2014*.

Wilt, T. J., M. K. Brawer, K. M. Jones, M. J. Barry, W. J. Aronson, S. Fox, J. R. Gingrich, J. T. Wei, P. Gilhooly, B. M. Grob, I. Nsouli, P. Iyer, R. Cartagena, G. Snider, C. Roehrborn, R. Sharifi, W. Blank, P. Pandya, G. L. Andriole, D. Culkin, T. Wheeler and Group Prostate Cancer Intervention versus Observation Trial Study

2012 Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer. *N Engl J Med* 367(3):203-213.

Wise, G. J. and D. A. Silver

1993 Fungal infections of the genitourinary system. *J Urol* 149(6):1377-1388.

Woolf, C. M.

1960 An investigation of the familial aspects of carcinoma of the prostate. *Cancer* 13:739-744.

Xu, J., S. D. Isaacs, J. Sun, G. Li, K. E. Wiley, Y. Zhu, F. C. Hsu, F. Wiklund, A. R. Turner, T. S. Adams, W. Liu, B. J. Trock, A. W. Partin, B. Chang, P. C. Walsh, H. Gronberg, W. Isaacs and S. Zheng

2008 Association of prostate cancer risk variants with clinicopathologic characteristics of the disease. *Clin Cancer Res* 14(18):5819-5824.

Zheng, S. L., J. Sun, F. Wiklund, S. Smith, P. Stattin, G. Li, H. O. Adami, F. C. Hsu, Y. Zhu, K. Balter, A. K. Kader, A. R. Turner, W. Liu, E. R. Bleecker, D. A. Meyers, D. Duggan, J. D. Carpten, B. L. Chang, W. B. Isaacs, J. Xu and H. Gronberg

2008 Cumulative association of five genetic variants with prostate cancer. *N Engl J Med* 358(9):910-919.

Zlotta, A. R., S. Egawa, D. Pushkar, A. Govorov, T. Kimura, M. Kido, H. Takahashi, C. Kuk, M. Kovylyna, N. Aldaoud, N. Fleshner, A. Finelli, L. Klotz, J. Sykes, G. Lockwood and T. H. van der Kwast

2013 Prevalence of prostate cancer on autopsy: cross-sectional study on unscreened Caucasian and Asian men. *J Natl Cancer Inst* 105(14):1050-1058.

## **10 ABREVIATURAS**



ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario

AMACR:  $\alpha$ -metilacil-coenzima A racemasa

AR: gen del Receptor de Andrógenos

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

ASAP: Proliferación Microacinar Atípica

CaP: Carcinoma de próstata (Tipo histológico: Adenocarcinoma Acinar)

CRPCa: CaP resistente a la castración

DHT: dihidrotestosterona

HGPIN: Neoplasia Intraepitelia Prostática de Alto Grado

HPA: Ensayo de la Protección de la Hibridación

HPB: Hiperplasia Prostática Benigna

LGPIN: Neoplasia Intraepitelial de Bajo Grado

miARN: microARN

PCA3: gen *Prostate Cancer Antigen 3*

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PIN: Neoplasia Intraepitelial prostática

PSA: Antígeno Prostático Específico

RLU: Unidad Luminosa Relativa

RR: Riesgo Relativo

s-PCA3: *score* de *PCA3*

TMA: Amplificación Mediada por transcripción



## **11 ANEXOS**



## **11.1 Anexo 1: Impreso de solicitud de estudio del s-PCA3**





BIOPAT

Biopatología Molecular  
Grup Assistència

## SOLICITUD DE ESTUDIO DEL GEN PCA3

Apellidos: ..... Nombre ..... Edad ..... años  
 Hª Clínica nº ..... Entidad aseguradora ..... Póliza nº .....  
 Médico solicitante Dr./a.: ..... Fecha: ..... / ..... / .....  
 Muestra: Orina obtenida después de examen digital rectal según protocolo específico.  
 (ver indicaciones de obtención y procesado de la muestra).

INFORMACIÓN CLÍNICA

## • PSA (determinaciones más recientes):

1. PSA1 ..... ng/ml. Índice PSA (PSAI/PSAT): ..... Fecha: ..... / ..... / .....  
 2. PSA1 ..... ng/ml. Índice PSA (PSAI/PSAT): ..... Fecha: ..... / ..... / .....  
 3. PSA1 ..... ng/ml. Índice PSA (PSAI/PSAT): ..... Fecha: ..... / ..... / .....  
 4. PSA1 ..... ng/ml. Índice PSA (PSAI/PSAT): ..... Fecha: ..... / ..... / .....  
 .....

• Volumen prostático (c.c./gr): ..... • Tacto rectal:  Normal  Sospechoso  .....

• Prostatitis:  No  Sí • Hiperplasia prostática:  No  Sí

## • Otras patologías:

.....

• Biopsia/s previa/s:  No  Sí:  Negativa  Sospechosa (ASAP)  Positiva  
 (carcinoma)

.....

• Tratamientos previos: .....

• Antecedentes familiares de carcinoma de próstata:  No  Sí

• Otros datos clínicos de interés: .....

CRITERIOS DE INDICACIÓN DE LA PRUEBA (marcar la opción que corresponda)

## 1. Antes de una primera biopsia de próstata.

a. Factores de riesgo (comorbilidad) que contraindican la práctica de biopsia

b. PSA elevado, no superior a 10 ng/ml.

c. PSA elevado en posible relación con patología benigna concomitante (prostatitis, hiperplasia...)

2. Después de una primera biopsia (o más) con resultado negativo, antes de practicar nueva biopsia. Adjuntar informe de biopsia/s previa/s o especificar resultados y número de cilindros estudiados: .....

3. Seguimiento clínico de paciente diagnosticado de carcinoma de próstata, no tratado con prostatectomía

radical (Diagnóstico de recidiva o progresión).

Especificar el tratamiento realizado: .....

OBSERVACIONES ADICIONALES

.....

.....



## **11.2 Anexo 2: *Raw Run Report s-PCA3***



## PROGENSA® PCA3 Assay Software

*Raw Run Report*

Run Number:	400791-20131025-BP-001
Operator:	biopat
Assay Date and Time:	2013-10-25 16:04:57
Site Name and Address:	BIOPAT Barcelona Spain
HC+ Serial Number:	400791
HC+ SW Revision:	GP2 - 5.16
Assay Software Protocol:	PCA3-PSA 1.0.0.0
Algorithm Version:	6, 2, 2, 3
Analysis Software Version:	PROGENSA® PCA3 Assay Software 6, 2, 2, 4

<u>Analyte</u>	<u>Concentration Lot ID</u>	<u>Expiration Date</u>
PCA3	629178	2014-04-15
PSA	629179	2014-03-15

Run Control Status:                   PCA3-PASS   PSA-PASS

Wash skipped: done

Legend of analysis errors:

- a - Outlier empty tube test failed
- c - Outlier Z-test failed
- d - Concentration incalculable
- g - Concentration is out-of-range low
- C - Outlier Z-test failed

Comments: 13/009

Operator Signature: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_  
 Reviewed by: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_

Page 1 of 6

Report Printed on 2014-05-13 17:01:06

## PROGENSA® PCA3 Assay Software

Run Number: 400791-20131025-BP-001

Operator: biopat

Assay Protocol: PCA3-PSA 1.0.0.0

Assay Date &amp; Time: 2013-10-25 16:04:57

Algorithm Version: 6, 2, 2, 3

TTU/Tube	Sample ID	Analyte	Total RLU	Dilution	Copies/mL	Status (sta)	Result
N1011780615498 is in position : 1							
1	152561719715041400862	PCA3	2,521	1	10	M	Valid
2	152561719715041400862	PCA3	2,322	1	0	M	Valid
3	152461719615041402276	PCA3	7,128	1	382	M	Valid
4	152461719615041402276	PCA3	5,818	1	282	M	Valid
5	152461719615041402276	PCA3	5,505	1	257	M	Valid
6	153661719815041400656	PCA3	38,592	1	2,585	M	Valid
7	153661719815041400656	PCA3	46,125	1	3,088	M	Valid
8	153661719815041400656	PCA3	36,042	1	2,414	M	Valid
9	153761719915041400433	PCA3	439,311	1	27,605	M	Valid
N1011780615489 is in position : 2							
11	153761719915041400433	PCA3	436,117	1	27,408	M	Valid
12	153761719915041400433	PCA3	398,743	1	25,100	M	Valid
13	153861720015041401158	PCA3	1,927,696	1	129,699	M	Valid
14	153861720015041401158	PCA3	1,960,458	1	132,272	M	Valid
15	153861720015041401158	PCA3	1,877,748	1	125,810	M	Valid
16	151161720115041401930	PCA3	23,958	1	1,590	M	Valid
17	151161720115041401930	PCA3	22,940	1	1,519	M	Valid
18	151261720215041401525	PCA3	973,847	1	61,534	M	Valid
19	151261720215041401525	PCA3	1,008,368	1	63,808	M	Valid
20	13-2212	PCA3	1,215,068	1	77,685	M	Valid
N1011780615490 is in position : 3							
21	13-2212	PCA3	1,222,768	1	78,211	M	Valid
22	13-2334	PCA3	87,674	1	5,790	M	Valid
23	13-2334	PCA3	94,268	1	6,212	M	Valid
24	13-2372	PCA3	68,024	1	4,524	M	Valid
25	13-2372	PCA3	64,602	1	4,301	M	Valid
26	13-2389	PCA3	62,724	1	4,179	M	Valid
27	13-2389	PCA3	72,516	1	4,815	M	Valid
28	13-2418	PCA3	84,751	1	5,603	M	Valid
29	13-2418	PCA3	72,337	1	4,803	M	Valid
30	13-2443	PCA3	653,730	1	40,968	M	Valid
N1011780615493 is in position : 4							
31	13-2443	PCA3	635,841	1	39,843	M	Valid
32	13-2482	PCA3	215,758	1	13,818	M	Valid
33	13-2482	PCA3	239,672	1	15,296	M	Valid
34	13-2484	PCA3	35,359	1	2,368	M	Valid
35	13-2484	PCA3	34,578	1	2,315	M	Valid

Page 2 of 6

Report Printed on 2014-05-13 17:01:06

For In Vitro Diagnostic Use.

Report must be reviewed by qualified laboratory personnel to verify sample results.

## PROGENSA® PCA3 Assay Software

Run Number: 400791-20131025-BP-001

Operator: biopat

Assay Protocol: PCA3-PSA 1.0.0.0

Assay Date &amp; Time: 2013-10-25 16:04:57

Algorithm Version: 6, 2, 2, 3

TTU/Tube	Sample ID	Analyte	Total RLU	Dilution	Copies/mL	Status (s.c.)	Result
36	13-2506	PCA3	399,782	1	25,164	M	Valid
37	13-2506	PCA3	362,458	1	22,863	M	Valid
38	13-2507	PCA3	52,162	1	3,487	M	Valid
39	13-2507	PCA3	51,047	1	3,413	M	Valid
40	13-2552	PCA3	24,769	1	1,646	M	Valid
N1011780615491 is in position : 5							
41	13-2552	PCA3	22,016	1	1,455	M	Valid
42	13-2563	PCA3	1,416,081	1	91,655	M	Valid
43	13-2563	PCA3	1,417,041	1	91,723	M	Valid
44	13-2592	PCA3	404,638	1	25,464	M	Valid
45	13-2592	PCA3	413,792	1	26,029	M	Valid
46	13-2619	PCA3	1,045,712	1	66,281	M	Valid
47	13-2619	PCA3	1,046,974	1	66,365	M	Valid
48	13-2621	PCA3	19,613	1	1,287	M	Valid
49	13-2621	PCA3	22,270	1	1,473	M	Valid
N1011780615492 is in position : 6							
51	162561719515031401459	PSA	2,054	1	0	M	Valid
52	162561719515031401459	PSA	2,315	1	96	M	Valid
53	162561719515031401459	PSA	2,273	1	59	M	Valid
54	162461719415031401073	PSA	11,753	1	8,078	M	Valid
55	162461719415031401073	PSA	11,544	1	7,903	M	Valid
56	162461719415031401073	PSA	11,266	1	7,670	M	Valid
57	163661719315031400326	PSA	107,463	1	87,874	M	Valid
58	163661719315031400326	PSA	124,318	1	102,051	M	Valid
59	163661719315031400326	PSA	100,535	1	82,062	M	Valid
60	163761719215031401465	PSA	842,808	1	782,069	M	Valid
N1011780615494 is in position : 7							
61	163761719215031401465	PSA	519,519	1	433,400	M	Valid
62	163761719215031401465	PSA	738,526	1	672,485	M	Valid
63	163861719015031400853	PSA	2,408,793	1	3,185,979	M	Valid
64	163861719015031400853	PSA	2,445,656	1	3,268,229	M	Valid
65	163861719015031400853	PSA	2,451,254	1	3,280,871	M	Valid
66	161161718915031401777	PSA	45,038	1	35,777	M	Valid
67	161161718915031401777	PSA	42,004	1	33,256	M	Valid
68	161261719115031401618	PSA	1,600,299	1	1,731,266	M	Valid
69	161261719115031401618	PSA	1,562,050	1	1,675,625	M	Valid
70	13-2212	PSA	1,227,776	1	1,227,181	M	Valid

Page 3 of 6

Report Printed on 2014-05-13 17:01:06

For In Vitro Diagnostic Use.

Report must be reviewed by qualified laboratory personnel to verify sample results.

**PROGENSA® PCA3 Assay Software**

Run Number: 400791-20131025-BP-001

Operator: biopat

Assay Protocol: PCA3-PSA 1.0.0.0

Assay Date &amp; Time: 2013-10-25 16:04:57

Algorithm Version: 6, 2, 2, 3

TTU/Tube	Sample ID	Analyte	Total RLU	Dilution	Copies/mL	Status (%)	Result
N1011780615495 is in position : 8							
71	13-2212	PSA	1,180,441	1	1,168,673	M	Valid
72	13-2334	PSA	933,306	1	880,729	M	Valid
73	13-2334	PSA	906,266	1	850,891	M	Valid
74	13-2372	PSA	458,002	1	397,442	M	Valid
75	13-2372	PSA	428,345	1	369,901	M	Valid
76	13-2389	PSA	347,876	1	296,525	M	Valid
77	13-2389	PSA	312,136	1	264,544	M	Valid
78	13-2418	PSA	171,783	1	142,300	M	Valid
79	13-2418	PSA	241,734	1	202,585	M	Valid
80	13-2443	PSA	1,372,214	1	1,413,045	M	Valid
N1011780615496 is in position : 9							
81	13-2443	PSA	773,987	1	709,272	M	Valid
82	13-2482	PSA	603,556	1	536,741	M	Valid
83	13-2482	PSA	624,373	1	557,250	M	Valid
84	13-2484	PSA	138,519	1	114,042	M	Valid
85	13-2484	PSA	143,573	1	118,319	M	Valid
86	13-2506	PSA	377,751	1	323,541	M	Valid
87	13-2506	PSA	401,666	1	345,358	M	Valid
88	13-2507	PSA	56,402	1	45,224	M	Valid
89	13-2507	PSA	53,687	1	42,966	M	Valid
90	13-2552	PSA	136,317	1	112,180	M	Valid
N1011780615497 is in position : 10							
91	13-2552	PSA	120,470	1	98,810	M	Valid
92	13-2563	PSA	1,394,419	1	1,442,646	M	Valid
93	13-2563	PSA	1,292,724	1	1,309,356	M	Valid
94	13-2592	PSA	888,913	1	831,906	M	Valid
95	13-2592	PSA	870,086	1	811,449	M	Valid
96	13-2619	PSA	919,151	1	865,071	M	Valid
97	13-2619	PSA	749,867	1	684,198	M	Valid
98	13-2621	PSA	109,545	1	89,622	M	Valid

Page 4 of 6

Report Printed on 2014-05-13 17:01:06

*For In Vitro* Diagnostic Use.

Report must be reviewed by qualified laboratory personnel to verify sample results.

**PROGENSA® PCA3 Assay Software**

Run Number: 400791-20131025-BP-001  
 Operator: biopat

Assay Protocol: PCA3-PSA 1.0.0.0  
 Assay Date & Time: 2013-10-25 16:04:57  
 Algorithm Version: 6, 2, 2, 3

99	13-2621	PSA	144,568	1	110,162	M	Valid
----	---------	-----	---------	---	---------	---	-------

Wash skipped: done

Legend of analysis errors:

- a - Outlier empty tube test failed
- c - Outlier Z-test failed
- d - Concentration incalculable
- g - Concentration is out-of-range low
- C - Outlier Z-test failed

**Status Codes**

<Tube Status Codes> e-tube status flag f-run failed h-high background i-invalidated  
 j-jam p-paused x-no data for this tube M-barcode for specimen ID was manually entered  
 For *In Vitro* Diagnostic Use

Page 5 of 6

Report Printed on 2014-05-13 17:01:06

For *In Vitro* Diagnostic Use.

Report must be reviewed by qualified laboratory personnel to verify sample results.

**PROGENSA® PCA3 Assay Software**

Run Number: 400791-20131025-BP-001

Operator: biopat

Assay Protocol: PCA3-PSA 1.0.0.0

Assay Date &amp; Time: 2013-10-25 16:04:57

Algorithm Version: 6, 2, 2, 3

**Exceptions Summary**

Sample ID	PCA3 copies/mL	PCA3 Status (s:a)	PSA copies/mL	PSA Status (s:a)	PCA3 Score

Page 6 of 6

Report Printed on 2014-05-13 17:01:06

*For In Vitro Diagnostic Use.*

Report must be reviewed by qualified laboratory personnel to verify sample results.

### **11.3 Anexo 3: Ratio Report PCA3**



PROGENSA® PCA3 Assay Software - Ratio Report  
*Ratio Report*



Match Number:	MATCH-400791-20131025-BP-001
Operator:	biopat
Match Date and Time:	2013-10-25 16:04:56
Match Type:	Automatic
Site Name and Address:	BIOPAT Barcelona Spain
Algorithms Version:	6, 2, 2, 3
Analysis Software Version:	PROGENSA® PCA3 Assay Software 6, 2, 2, 4

Run(s) Included in this report:

PCA3: 400791-20131025-BP-001

PSA: 400791-20131025-BP-001

Wash skipped: done

Legend of analysis errors:

Comments: 13/009.

Operator Signature: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_  
Reviewed by: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_

## PROGENSA® PCA3 Assay Software - Ratio Report

Run Number: MATCH-400791-20131025-BP-001  
 Operator: biopat

Match Date: 2013-10-25 16:04:56  
 Algorithm Version: 6, 2, 2, 3

Sample ID	PCA3 Copies/mL	PCA3 Status (s:a)	PSA Copies/mL	PSA Status (s:a)	PCA3 Score	Match Status
13-2212	77,948		1,197,927		65	A
13-2334	6,001		865,810		6	A
13-2372	4,412		383,672		11	A
13-2389	4,497		280,534		16	A
13-2418	5,203		172,442		30	A
13-2443	40,405		1,061,159		38	A
13-2482	14,557		546,995		26	A
13-2484	2,342		116,180		20	A
13-2506	24,014		334,449		71	A
13-2507	3,450		44,095		78	A
13-2552	1,550		105,495		14	A
13-2563	91,689		1,376,001		66	A
13-2592	25,746		821,677		31	A
13-2619	66,323		774,634		85	A
13-2621	1,380		104,392		13	A

## Status Codes

<Tube Status Codes> e-tube status flag f-run failed h-high background i-invalidated  
 j-jam p-paused x-no data for this tube  
 <Match Status Codes> A-Automatic Match M-Manual Match  
 For In Vitro Diagnostic Use

Page 2 of 2

Report Printed on 2013-10-25 16:05:35

For In Vitro Diagnostic Use.

Report must be reviewed by qualified laboratory personnel to verify sample results.

#### **11.4 Anexo 4: Informe de resultados del s-PCA3**





**BIOPAT**  
 Biopatología Molecular  
 Grup Assistència

**INFORME DE PATOLOGÍA MOLECULAR**

**REGISTRO Nº 13/B/001595**

Nombre: _____	Sexo: M	Edad: 68 años
Dr. _____	Fecha recepción: 09/12/2013	Fecha informe: 23/12/2013
Referencia: JRM	Muestra Nº: 2013/003069	
Información clínica: PSAt 8 ng/ml (octubre 2013). Tacto rectal normal. Seis biopsias previas PIN de alto grado. PCA3 Score: 29 (diciembre 2009).		
Muestra remitida: Orina obtenida después de examen digital rectal.		

**ESTUDIO REALIZADO**

**Detección del ARNm del gen 3 del cáncer de próstata (PCA3).**

Método: Detección del ARNm de los genes PCA3 y PSA mediante amplificación mediada por transcripción (TMA) a partir de muestras de orina obtenidas tras examen digital rectal (PROGENSA PCA3).

El gen PSA actúa como normalizador del número de células prostáticas presentes en la muestra y el resultado (PCA3 Score) corresponde al cociente PCA3/PSA.

**RESULTADO**

**PCA3 Score: 140**

**INTERPRETACIÓN**

El PCA3 Score es directamente proporcional al riesgo de carcinoma en la biopsia de próstata. En base a la literatura actualmente disponible el resultado se considera positivo a partir del cociente 35.

Natalia Rodón  
 Nº Col.: 20977-C

Dr. Xavier Puig  
 Nº Col.: 10666



**BIOPAT**  
Biopatología Molecular  
Grup Assistència

**INFORME DE PATOLOGÍA MOLECULAR**

**REGISTRO Nº 13/B/001689**

Nombre: \_\_\_\_\_  
Dr. \_\_\_\_\_

Sexo: M Edad: 48 años  
Fecha recepción: 30/12/2013  
Fecha informe: 17/02/2014  
Muestra Nº: 2013/003252

Referencia : JBM

Información clínica: PSA<sub>t</sub> 5,9 ng/ml (24/12/2013). Tacto rectal normal.

Muestra remitida: Orina obtenida después de examen digital rectal.

**ESTUDIO REALIZADO**

**Detección del ARNm del gen 3 del cáncer de próstata (PCA3).**

Método: Detección del ARNm de los genes PCA3 y PSA mediante amplificación mediada por transcripción (TMA ) a partir de muestras de orina obtenidas tras examen digital rectal (PROGENSA PCA3).

El gen PSA actúa como normalizador del número de células prostáticas presentes en la muestra y el resultado (PCA3 Score) corresponde al cociente PCA3/PSA.

**RESULTADO**

**PCA3 Score: 5**

**INTERPRETACIÓN**

El PCA3 Score es directamente proporcional al riesgo de carcinoma en la biopsia de próstata. En base a la literatura actualmente disponible el resultado se considera positivo a partir del cociente 35.

Natalia Rodón  
Nº Col.: 20977-C

Dr. Xavier Puig  
Nº Col.: 10666



**BIOPAT**  
Biopatología Molecular  
Grup Assistència

**INFORME DE PATOLOGÍA MOLECULAR**

**REGISTRO Nº 13/B/001435**

Nombre: \_\_\_\_\_

Sexo: M Edad: 80 años

Dr. \_\_\_\_\_

Fecha recepción: 31/10/2013

Fecha informe: 04/12/2013

Muestra Nº: 2013/002701

Referencia : MFG

Información clínica: Tacto rectal normal. Biopsia previa positiva (carcinoma).

Muestra remitida: Orina obtenida después de examen digital rectal.

**ESTUDIO REALIZADO**

**Detección del ARNm del gen 3 del cáncer de próstata (PCA3).**

Método: Detección del ARNm de los genes PCA3 y PSA mediante amplificación mediada por transcripción (TMA ) a partir de muestras de orina obtenidas tras examen digital rectal (PROGENSA PCA3).

El gen PSA actúa como normalizador del número de células prostáticas presentes en la muestra y el resultado (PCA3 Score) corresponde al cociente PCA3/PSA.

**RESULTADO**

**No valorable**

**COMENTARIO**

Muestra con representación insuficiente de celularidad prostática.

Se recomienda repetir el estudio en una nueva muestra.

Dra. Ruth Román  
Nº Col.: 20512-C

Dr. Xavier Puig  
Nº Col.: 10666



## **11.5 Anexo 5: Comunicaciones en Congresos**



- **VI Congreso Nacional de Laboratorio Clínico.**  
**Barcelona (España), 2012.**  
Comunicación Oral:  
“Estudio del gen PCA3 en el diagnóstico del cáncer de próstata”.
- **XVIII Simposio de la Sociedad Catalana de Urología.**  
**Roses (España), 2012.**  
Comunicación Oral:  
“Estudio del gen PCA3 en orina de pacientes con PSA alterado: valor diagnóstico, predicción del grado de Gleason y volumen tumoral”.
- **LXXVIII Congreso Nacional de Urología.**  
**Granada (España), 2013.**  
Comunicación Oral:  
“El cociente ARNmPCA3/ARNmPSA en orina post-masaje prostático predice la probabilidad de biopsia prostática positiva y la agresividad tumoral”.
- **XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y División Española de la Academia Internacional de Patología (SEAP-IAP).**  
**Cádiz (España), 2013.**  
Comunicación Oral:  
“El gen PCA3, un nuevo biomarcador diagnóstico y predictivo del grado de Gleason y el volumen tumoral en el carcinoma de próstata”.
- **103rd Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology (USCAP)**  
**San Diego (USA), 2014.**  
Póster:  
“PCA3 gene in prostate cancer diagnosis: Improving biopsy efficiency and predicting tumor grade and extension”.

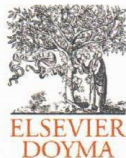


## **11.6 Anexo 6: Artículo publicado**



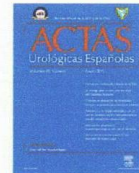
Rodón N et al. "Valor Diagnóstico y predictivo del estudio en orina del gen PCA3 para el manejo clínico de pacientes con PSA alterado". *Actas Urol Esp.* 2013;38:150-155.

Actas Urol Esp. 2014;38(3):150-155



Actas Urológicas Españolas

www.elsevier.es/actasuro



ORIGINAL ARTICLE

Diagnostic and predictive value of urine PCA3 gene expression for the clinical management of patients with altered prostate-specific antigen<sup>☆</sup>

N. Rodón<sup>a,\*</sup>, I. Trías<sup>a,b</sup>, M. Verdú<sup>a,b</sup>, R. Román<sup>a</sup>, A. Domínguez<sup>c</sup>, M. Calvo<sup>d</sup>, J.M. Banus<sup>c</sup>, A.M. Ballesta<sup>e</sup>, M.L. Maestro<sup>f</sup>, X. Puig<sup>a,b,g</sup>

<sup>a</sup> BIOPAT, Biopatología Molecular, S.L., Grup Assistència, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Histopat Laboratoris, S.L., Barcelona, Spain

<sup>c</sup> ICUN, Institut Català d'Urologia i Nefrologia, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Departamento de Estadística, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Analiza. S. Análisis Clínicos, Hospital Moncloa, Madrid, Spain

<sup>f</sup> Unidad de Genómica y Reproducción Asistida, Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid, Spain

<sup>g</sup> Hospital de Barcelona, SCIAS, Grup Assistència, Barcelona, Spain

Received 25 April 2013; accepted 17 July 2013

Available online 17 December 2013

KEYWORDS

PCA3;  
Prostate-specific antigen;  
Screening;  
Prostate cancer;  
Gleason;  
Tumor aggressiveness

Abstract

**Objective:** Analyze the impact of the introduction of the study of PCA3 gene in post-prostatic massage urine in the clinical management of patients with altered PSA, evaluating its diagnostic ability and predictive value of tumor aggressiveness.

**Methods:** Observational, prospective, multicenter study of patients with suspected prostate cancer (PC) candidates for biopsy. We present a series of 670 consecutive samples of urine collected post-prostatic massage for three years in which we determined the «PCA3 score» (s-PCA3). Biopsy was only indicated in cases with s-positive PCA3.

**Results:** The s-PCA3 was positive in 43.7% of samples. In the 124 biopsies performed, the incidence of PC or atypical small acinar proliferation was 54%, reaching 68.6% in s-PCA3  $\geq$  100. Statistically significant relationship between the s-PCA3 and tumor grade was demonstrated. In cases with s-PCA3 between 35 and 50 only 23% of PC were high grade (Gleason  $\geq$  7), compared to 76.7% in cases with s-PCA3 over 50. There was a statistically significant correlation between s-PCA3 and cylinders affected. Both relationships were confirmed by applying a log-linear model.

**Conclusions:** The incorporation of PCA3 can avoid the need for biopsies in 54% of patients. s-PCA3 positivity increases the likelihood of a positive biopsy, especially in higher s-PCA3 100 (68.6%). s-PCA3 is also an indicator of tumor aggressiveness and provides essential information in making treatment decisions.

© 2013 AEU. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

<sup>☆</sup> Please cite this article as: Rodón N, Trías I, Verdú M, Román R, Domínguez A, Calvo M, et al. Valor diagnóstico y predictivo del estudio en orina del gen PCA3 para el manejo clínico de pacientes con PSA alterado. *Actas Urol Esp.* 2013;38:150-155.

\* Corresponding author.

E-mail address: nrodon@biopat.es (N. Rodón).

2173-5786/\$ - see front matter © 2013 AEU. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**PALABRAS CLAVE**

PCA3;  
 Antígeno prostático específico;  
 Cribado;  
 Cáncer de próstata;  
 Gleason;  
 Agresividad tumoral

**Valor diagnóstico y predictivo del estudio en orina del gen PCA3 para el manejo clínico de pacientes con PSA alterado****Resumen**

**Objetivo:** Analizar el impacto de la introducción del estudio del gen PCA3 en orina posmasaje prostático, en el manejo clínico de pacientes con PSA alterado, valorando su capacidad diagnóstica y predictiva de agresividad tumoral.

**Métodos:** Estudio observacional, prospectivo y multicéntrico de pacientes con sospecha de adenocarcinoma de próstata (AP) candidatos a biopsia. Presentamos una serie de 670 muestras consecutivas de orina posmasaje prostático recogidas durante 3 años en las que se determinó el «score de PCA3» (s-PCA3). Se indicó biopsia únicamente en los casos con s-PCA3 positivo.

**Resultados:** El s-PCA3 fue positivo en el 43,7% de las muestras. En las 124 biopsias realizadas, la incidencia de AP o proliferación microacinar atípica fue del 54%, llegando al 68,6% en s-PCA3  $\geq$  100. Demostramos relación estadísticamente significativa entre el s-PCA3 y el grado tumoral. En los casos con s-PCA3 positivo pero inferior a 50, solo el 23% de AP fueron de alto grado (Gleason  $\geq$  7); en cambio, en los casos con s-PCA3 superior a 50 lo fueron el 76,7%. La relación entre el s-PCA3 y el porcentaje de cilindros afectados en la biopsia fue significativa. Ambas relaciones se confirmaron al aplicar el modelo log-lineal.

**Conclusiones:** La incorporación del PCA3 permite prescindir de la biopsia en un 54% de los pacientes. La positividad del s-PCA3 aumenta la probabilidad de biopsia positiva, especialmente en s-PCA3 superior a 100 (68,6%). El s-PCA3 es también un indicador de agresividad tumoral y aporta información esencial en la toma de decisiones terapéuticas.

© 2013 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

**Introduction**

The generalization of the analysis of prostate-specific antigen (PSA) in serum for early detection of prostate adenocarcinoma (PA) has generated a significant increase in the number of prostate biopsies; however, the low specificity of PSA generates a significant volume of indications for biopsy in patients with benign pathologies. About 75% of the biopsies are negative.<sup>1</sup> In the group of patients with altered PSA values but not above 10 ng/ml, which is known as the 'gray area' of the diagnosis,<sup>2</sup> patients with benign prostatic hyperplasia (BPH), prostatitis, and PA are mixed. In the first 2 cases, the biopsy will be negative and it will be repeated if the PSA levels persist. In the third case, the patients are diagnosed with PA but, in many cases, they are questionable clinical significance carcinomas and in elderly patients.<sup>3</sup> In this context, radical surgical treatment does not necessarily modify the patient's life expectancy.<sup>4</sup> In autopsy series reviews, the incidental finding of hidden PA in 30% of patients from 50 to 70 and in 70% after 70 is reported.<sup>5</sup> These neoplasms produce no symptoms and do not compromise the patient's life, but they are able to elevate the serum PSA and trigger the clinical protocol of biopsy and surgical treatment. Currently, there is consensus on the problems generated by PA screening with PSA, and the problems it creates are considered more relevant than the benefits in terms of reducing mortality.<sup>1,6</sup> The U.S. agency of preventive medicine (U.S. Preventive Services Task Force) recently issued a grade D recommendation which advises against PA screening with PSA,<sup>7</sup> and it has raised reflections and discussions in subsequent articles, which reflect the need to rethink about the current protocols for screening, diagnosis, and treatment of PA and deepen in the search for new specific biomarkers predictive of PA.<sup>8,9</sup>

The PCA3 gene, widely studied in recent years, is probably one of the first biomarkers which is already under clinical application. This gene, located on chromosome 9q21-22, is transcribed only in prostate tissue and is strongly overexpressed in malignant prostate tissue compared to benign or normal adjacent one.<sup>10</sup> In contrast to the PSA, overexpression of PCA3 is specific of PA and independent from prostate volume and the presence of BPH.<sup>11</sup> Since 2006, a diagnostic kit of clinical application for the detection of mRNA levels of the PCA3 gene in urine samples collected after prostate massage has been marketed, with which a PCA3 score is obtained (s-PCA3).<sup>12</sup>

A meta-analysis published in 2010 attributes to PCA3 a negative predictive value of 87.8–98%, recognizing some diagnostic accuracy rates acceptable for use in the diagnosis of PA.<sup>13</sup> The test, moreover, is easy to implement both in the clinical protocol and in the laboratory. From the first studies carried out, a directly proportional relationship between the s-PCA3 and the percentage of subsequent positive biopsies became clear.<sup>11,14</sup> In some of the most recent studies, we also found a relationship between the s-PCA3 and different determinants of tumor aggressiveness such as the Gleason score, the tumor volume, and extracapsular invasion.<sup>11,15,16</sup> The European Association of Urology, in its 2010 Guidelines, includes the use of biomarkers complementary to the PSA, among which the PCA3 stands out due to its higher specificity and sensitivity.<sup>17</sup>

In this paper we analyze the impact of the introduction of PCA3 in the clinical management of patients with altered PSA, with a special focus on reducing the indication for prostate biopsy and its alleged predictive ability of tumor aggressiveness in patients already diagnosed with PA.

## Materials and methods

We performed an observational, prospective, and multicenter study of patients with suspected PA candidates for prostate biopsy. A protocol of indications with informed consent was established and submitted to an Ethics Committee.

### Samples and patients

670 urine samples were included in the study after prostate massage corresponding to 598 consecutive patients presenting to the urologist consultation between October 2009 and November 2012. 66 patients had different urine samples studied throughout their clinical follow-up. For the comparative statistical analyses with other clinical parameters (age, serum PSA rate, presence of prostatitis, and prostate volume) we only used the last study of PCA3, excluding previous ones. This resulted in the exclusion of 72 samples. All the patients met some of the following criteria: elevated PSA and prior negative biopsy, altered PSA but lower than 10 ng/ml without prior biopsy, altered PSA and well-known benign prostatic disease (prostatitis, BPH) and high PSA in patients with comorbidity associated with increased risk in biopsy practice. We excluded patients with previous diagnosis of PA.

Age, the value of total PSA (ng/ml), and the prostate volume (cc) of the patients included were recorded. In the cases in which the biopsy was performed, the number of cylinders obtained and, when PA was diagnosed, the number of affected cylinders, the percentage of tumor, and Gleason score were recorded.

### PCA3 determination

The first voided urine after DRE with prostatic massage, consisting in 3 palpations per lobe, was collected, and the s-PCA3 was determined with the ProgenSA™PCA3Assay (Gen-Probe) kit. By means of quantification of PCA3 and PSA mRNA, an s-PCA3 was calculated according to the formula:  $(\text{PCA3 mRNA}/\text{PSA mRNA}) \times 1000$ . s-PCA3 higher than or equal to 35 was considered positive, interpreted as a high probability of detecting PA in a subsequent biopsy.<sup>12</sup> Biopsy was indicated only in cases with positive s-PCA3.

### Prostate biopsy protocol

Prostate biopsies were performed in the operating room under anesthesia with sedation, ultrasound-guided, and transrectally, obtaining a minimum of 5 cylinders per lobe, with additional samples in the case of finding suspicious nodules on the digital rectal examination or the ultrasound. In those patients who had already had prostate biopsies performed previously, these biopsies were performed by saturation, obtaining a minimum of 10 cylinders per lobe.

### Histopathological study

Two pathologists performed the histopathological study independently on serial sections (5 microns) of paraffin-embedded tissue and stained with hematoxylin-eosin

complemented with immunohistochemical study with race-mase (AMACR) and basal cell markers (p63 and 34BE12 cytokeratin) when it was necessary. The diagnostic entities covered were PA, atypical small acinar proliferation (ASAP), high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN), chronic prostatitis, other non-neoplastic processes, or normality. In the PA cases, the grade was determined following the Gleason patterns<sup>18</sup> and the number and percentage of affected cylinders were recorded.

The ASAP category was reserved for microglandular proliferations with morphological and immunohistochemical criteria of PA (loss of basal layer and/or expression of AMACR) but underrepresented in biopsies to support a definitive diagnosis of PA.

### Statistical analysis

The possible associations between pairs of categorical variables were analyzed using Fisher's exact test, while for the continuous variables we used the simple linear regression model. Finally, to determine the association between a shortlist of three categorical variables, the best log-linear model was established using the stepwise algorithm and the Akaike information criterion. The algorithm was based on the full model, i.e., with all possible interactions among the 3 variables.<sup>19</sup> All the statistical analyses were performed with the R v.2.15.1 package (©2012, RDevelopmentCoreTeam).<sup>20</sup>

## Results

The study included 670 urine samples of 598 patients with a mean age of 65.7 years (standard deviation of 8). In the majority of cases (90.6%), the PCA3 test was indicated due to elevated PSA and negative previous biopsy or due to alteration of PSA not exceeding 10 ng/ml (Table 1). The information rate of the s-PCA3 was 98.2% and the average 47.3. The medians and ranges of the numeric variables studied are shown in Table 2. The s-PCA3 showed no statistically

Table 1 Indications for the study of PCA3.

Indication	Number of samples (%)
Negative prior biopsy	337 (50.3)
Elevated PSA $\leq$ 10 ng/ml	270 (40.3)
Risk factors for biopsy	27 (4.0)
Known benign pathology	20 (3.0)
Not specified	16 (2.4)
Total	670 (100)

Table 2 Description of the variables studied.

	Median (minimum-maximum)
Total PSA (ng/ml)	6 (0.6-134)
Prostate volume (cc)	53 (10-196)
Number of cylinders studied	11 (4-33)
Percentage of affected cylinders (%)	20 (4-100)

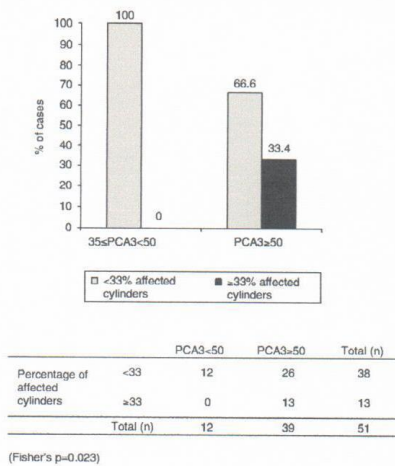


Figure 1 Percentage of affected cylinders depending on the s-PCA3 in patients with diagnosis of PA (n = 51).

significant relationship with age, the rate of serum PSA, the presence of prostatitis, or prostate volume. Of the total samples analyzed, 365 had a negative s-PCA3, corresponding to 328 patients. In these cases, accounting for 54.5% of the samples and 54% of the patients, no biopsy was indicated. Also, 293 samples (43.7%) showed a positive s-PCA3 and, in these cases, making a subsequent biopsy was recommended. Of the 124 biopsies studied, 56 (45.2%) were diagnosed with PA, 11 (8.8%) with ASAP, 10 (8.0%) with HGPIN, and 47 (38%) with mildness or normality. By placing the cut-off point of s-PCA3 at 100 or higher, the percentage of PA increased to 57.2%, while the percentages of ASAP and HGPIN did not change significantly (11.4 and 8.6%, respectively), and the percentage of biopsies with no evidence of malignancy decreased to 22.8%. The probability of positive biopsy increases with s-PCA3 ( $p=0.040$ ). The number of cylinders involved in the biopsy could be assessed in 51 cases; the remaining 5 were surgical resection samples. Comparing the percentage of cylinders affected in the biopsy (less than 33% vs. equal to or more than 33%) with the s-PCA3, it is shown that by increasing the s-PCA3, the percentage of affected cylinders increases and their relationship is statistically significant ( $p=0.023$ ) (Fig. 1). No patient with PA and s-PCA3 between 35 and 50 showed more than 33% of the studied cylinders involved. The s-PCA3 and Gleason score also showed a statistically significant relationship ( $p=0.002$ ). Only 23% of the patients with PA and s-PCA3 between 35 and 50 were high grade (Gleason  $\geq 7$ ). However, 76.7% of the patients with PA and s-PCA3 exceeding or equal to 50 had a Gleason  $\geq 7$  (Fig. 2).

Selecting the best log-linear model including the s-PCA3 variables, Gleason score, and percentage of biopsy cylinders affected in the biopsy retained in the final equation the interaction between the s-PCA3 and Gleason score ( $p=0.00006$ ), confirming the relationship detected with the Fisher's exact test. The model obtained also maintained the

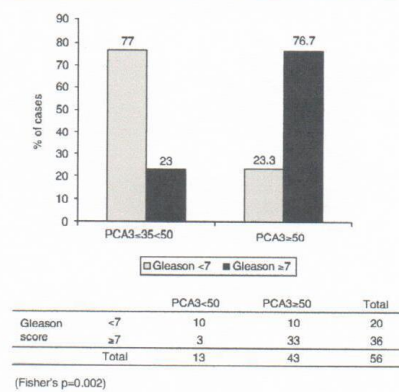


Figure 2 Distribution of the Gleason score depending on the s-PCA3 in patients with diagnosis of PA (n = 56).

s-PCA3 interaction and the percentage of affected cylinders ( $p=0.004$ ) (Fig. 3).

### Discussion

In our series, the s-PCA3 was independent of the PSA, patient age, prostate volume, and the presence of prostatitis, according to what was published in previous studies.<sup>21,22</sup> The incorporation of the determination of s-PCA3 in PA screening significantly reduced the indication for biopsy (54%), and in patients with positive s-PCA3, the positivity of the biopsy markedly increased (45.2%) compared to that

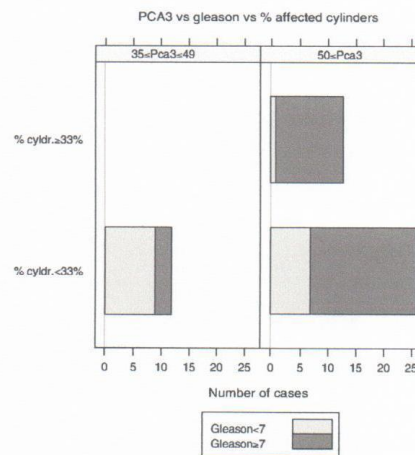


Figure 3 Bar chart with variables s-PCA3, Gleason score, and percentage of cylinders affected in the biopsy, represented simultaneously.

obtained only in accordance with the figures of the PSA. The s-PCA3 showed a statistically significant relationship with the Gleason score and the percentage of affected cylinders.

These results agree with those reported in previously published meta-analyses and reviews.<sup>11,13</sup> In the only previous study on Spanish population, the rates of diagnostic accuracy of PCA3 in clinical settings were assessed, showing as well that their incorporation improves screening and reduces the number of biopsies indicated. Using a cut-off point of 100 for the s-PCA3, we obtained, in our series, 57.2% of biopsies with PA, a slightly higher percentage than that previously reported in Spanish population.<sup>14</sup> Additionally, we checked, in our population, the relationship between the PCA3 and the parameters associated with tumor aggressiveness such as the Gleason score and percentage of cylinders affected in the biopsy. In none of the biopsies in our series of patients with s-PCA between 35 and 50, involvement was observed in over 33% of the cylinders, and also, in this same interval of s-PCA3, 77% of the detected PAs had a Gleason below 7. These figures are reversed in patients with PA and s-PCA3 higher than or equal to 50 and are consistent with those reported by van Poppel et al. in a European study that enrolled more than 1,000 patients.<sup>16</sup> These data indicate that in patients with a diagnosis of PA but with s-PCA3 lower than 50, the lower grade and stage PAs predominate, potential candidates for conservative clinical approach.

The 54% reduction in the indication for biopsy obtained in our study is a first argument which, together with the data from previous studies,<sup>11,14</sup> supports the introduction of the PCA3 as a complementary test in the management of patients suspected of PA. A second argument is provided by the increased efficiency of PCA3-guided biopsies.<sup>23,24</sup> If with the serum PSA and the urological examination the percentage of positive biopsies is lower than 40%,<sup>25</sup> with the protocol of indications of PCA3 of our study, using a cut-off point greater than or equal to 35, it rises to 45.2% and reaches 54% if we include the cases labeled as ASAP that, in our laboratory, correspond to proliferations with morphology and immunophenotype of PA but underrepresented in the biopsies to support a conclusive diagnosis. Additionally, the predictive value of grade and stage of s-PCA3 brings a new resource to assess the potential clinical significance of the PA before conducting the biopsy and selecting the suitable clinical behavior. Regardless of the importance of consolidating these results prospectively expanding the volume of cases studies and their clinical follow-up, the currently available information suggests that the s-PCA3 can provide new ways of solving the problem that the screening for prostate cancer is generating with the classic clinical and biochemical resources, of suboptimal specificity and efficiency.

The use of serum PSA as an element of PA screening has not only enabled us to deepen in the knowledge of its biological behavior, but it has also shown that our limitations to predict it, in order to reduce mortality, entail, in a significant proportion of cases, diagnoses and treatments of doubtful efficiency. The incorporation of the PCA3 test and other biomarkers studied, together with the technological optimization of the radiological and surgical techniques, should provide, in the short term, new criteria for selecting the ideal clinical behavior in patients with suspected PA and the best therapeutic option in those already diagnosed by biopsy.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgements

To Eva Torija and Ana Guardiola for secretarial assistance. To Beatriz García-Peláez, Verónica Serrano, Patricia García, Bego Martínez, Nuria Arraiza and Cora Ferrer for technical assistance.

## References

- Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med*. 2009;360:1320–8.
- Pérez-Lanzac-Lorca A, Barco-Sánchez A, Romero E, Martínez-Peinado A, López-Elorza F, Sánchez-Sánchez E, et al. Correlación del cociente PSA complejo/PSA total con el cociente PSA libre/PSA total, sensibilidad y especificidad de ambos marcadores para el diagnóstico del cáncer de próstata. *Actas Urol Esp*. 2013;37:498–503.
- Baumann C, Behbahani TE. EAU guidelines for prostate cancer: to screen or not to screen? *Actas Urol Esp*. 2012;36:1.
- Wilt TJ, Brawer MK, Jones KM, Barry MJ, Aronson WJ, Fox S, et al. Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer. *N Engl J Med*. 2012;367:203–13.
- Coley CM, Barry MJ, Fleming C, Mulley AG. Early detection of prostate cancer. Part I: prior probability and effectiveness of tests. *The American College of Physicians. Ann Intern Med*. 1997;126:394–406.
- Andriole GL, Crawford ED, Grubb 3rd RL, Buys SS, Chia D, Church TR, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med*. 2009;360:1310–9.
- Moyer VA, U.S. Preventive Service Task Force. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*. 2012;157:120–34.
- Fernández-Serra A, Rubio-Briones J, García-Casado Z, Solsona JA, López-Guerrero JA. Prostate cancer: the revolution of the fusion genes. *Actas Urol Esp*. 2011;35:420–8.
- Ribeiro da Silva MN, Tobias-Machado M, Lima-Pompeo AC, Reis LO, da Silva Pinhal MA. Prostate cancer: promising biomarkers related to aggressive disease. *Actas Urol Esp*. 2012;36:484–90.
- Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999;59:5975–9.
- Hessels D, Schalken JA. The use of PCA3 in the diagnosis of prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2009;6:255–61.
- Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, Blase A, Bodruq S, Clark C, et al. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem*. 2006;52:1089–95.
- Ruiz-Aragón J, Márquez-Peláez S. Evaluación del test PCA3 para el diagnóstico de cáncer de próstata: revisión sistemática y metanálisis. *Actas Urol Esp*. 2010;34:346–55.
- Rubio-Briones J, Fernández-Serra A, Ramírez M, Rubio L, Collado A, Casanova J, et al. Outcomes of expanded use of PCA3 testing in a Spanish population with clinical suspicion of prostate cancer. *Actas Urol Esp*. 2011;35:589–96.
- Day JR, Jost M, Reynolds MA, Groskopf J, Rittenhouse H. PCA3: from basic molecular science to the clinical lab. *Cancer Lett*. 2011;301:1–6.
- Van Poppel H, Haese A, Graefen M, de la Taille A, Irani J, de Reijke T, et al. The relationship between Prostate

- Cancer gene 3 (PCA3) and prostate cancer significance. *BJU Int.* 2012;109:360–6.
17. Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Manson M, Matveev V, et al. Guía de la EAU sobre el cáncer de próstata. Parte I: cribado, diagnóstico y tratamiento del cáncer clínicamente localizado. *Actas Urol Esp.* 2011;35:501–14.
  18. 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.
  19. Friendly M. Working with categorical data with R and the vcd and vcdExtra packages. York University, Toronto [publicado 26 Jun 2013]. Disponible en: <http://cran.r-project.org/web/packages/vcdExtra/vignettes/vcd-tutorial.pdf>
  20. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2011. ISBN 3-900051-07-0.
  21. De Luca S, Passera R, Milillo A, Coda R, Randone DF. Histological chronic prostatitis and high-grade prostate intra-epithelial neoplasia do not influence urinary prostate cancer gene 3 score. *BJU Int.* 2012;110:E778–82.
  22. Haese A, de la Taille A, van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PF, et al. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur Urol.* 2008;54:1081–8.
  23. De la Taille A, Irani J, Graefen M, Chun F, de Reijke T, Kil P, et al. Clinical evaluation of the PCA3 assay in guiding initial biopsy decisions. *J Urol.* 2011;185:2119–25.
  24. Shariat SF, Scherr DS, Gupta A, Bianco Jr FJ, Karakiewicz PI, Zeltser IS, et al. Emerging biomarkers for prostate cancer diagnosis, staging, and prognosis. *Arch Esp Urol.* 2011;64:681–94.
  25. Remzi M, Fong YK, Dobrovits M, Anagnostou T, Seitz C, Waldert M, et al. The Vienna nomogram: validation of a novel biopsy strategy defining the optimal number of cores based on patient age and total prostate volume. *J Urol.* 2005;174:1256–60, discussion 1260–1251; author reply 1261.

