

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



**TESIS DOCTORAL**

Polimorfismos en el gen de la calicreína humana 2 (KLK2) y el desarrollo de cáncer de próstata. Relación con la proteína glandular humana 2(HK2) y las formas libre, total y ligada del PSA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Silvia García Barreras**

Directores

Miguel Téllez Martínez-Fornés

Jesús Moreno Sierra

Silvia Veganzones de Castro

**Madrid, 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Programa de Doctorado en Investigación Biomédica**



**POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA CALICREÍNA HUMANA 2  
(KLK2) Y EL DESARROLLO DE CÁNCER DE PRÓSTATA. RELACIÓN  
CON LA PROTEÍNA GLANDULAR HUMANA 2(HK2) Y LAS  
FORMAS LIBRE, TOTAL Y LIGADA DEL PSA**

Tesis Doctoral

**SILVIA GARCÍA BARRERAS**

Madrid, 2015



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Programa de Doctorado en Investigación Biomédica**



**POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA CALICREÍNA HUMANA 2  
(KLK2) Y EL DESARROLLO DE CÁNCER DE PRÓSTATA. RELACIÓN  
CON LA PROTEÍNA GLANDULAR HUMANA 2(HK2) Y LAS  
FORMAS LIBRE, TOTAL Y LIGADA DEL PSA**

Tesis Doctoral

**Silvia García Barreras**

Directores

**Miguel Téllez Martínez-Fornés**

*Jefe del Servicio de Urología del  
Hospital Universitario Severo  
Ochoa*

**Jesús Moreno Sierra**

*Jefe del Servicio de Urología  
del Hospital Clínico  
San Carlos  
Profesor UCM*

**Silvia Veganzones de Castro**

*Dra. Ciencias Biológicas  
Instituto Investigación  
Sanitaria San Carlos*

Madrid, 2015





## Informe del Director de la Tesis Doctoral

<b>DATOS DE LA TESIS DOCTORAL</b>	
<b>Nombre del Doctorando</b>	<i>Silvia García Barreras</i>
<b>Título de la Tesis</b>	<b><i>POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA CALICREÍNA HUMANA 2 (KLK2) Y EL DESARROLLO DE CÁNCER DE PRÓSTATA. RELACIÓN CON LA PROTEÍNA GLANDULAR HUMANA 2(HK2) Y LAS FORMAS LIBRE, TOTAL Y LIGADA DEL PSA</i></b>
<b>Facultad o Centro</b>	<i>Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid</i>

<b>DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL</b>	
<b>Nombre Completo</b>	<i>Jesús Moreno Sierra</i>
<b>Centro al que pertenece y dirección</b>	<i>Facultad de medicina. Departamento de Cirugía. Universidad Complutense. Servicio de Urología. Hospital Clínico San Carlos. Madrid</i>
<b>D.N.I/Pasaporte</b>	<i>01102822H</i>
<b>e-mail</b>	<i>dr_jmoreno@hotmail.com</i>

	<b>VALORACIÓN DE LA TESIS</b>			
	<b>Muy Buena</b>	<b>Buena</b>	<b>Suficiente</b>	<b>Deficiente</b>
<b>Originalidad</b>	X			
<b>Definición Objetivos</b>	X			
<b>Metodología</b>	X			
<b>Relevancia Resultados</b>	X			
<b>Discusión / Conclusiones</b>	X			

**INFORME** (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

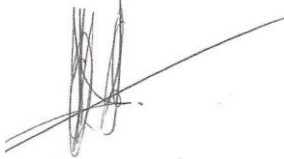
El estudio presentado por Dña. Silvia García Barreras ha sido diseñado y dirigido por mí personalmente desde su inicio, realizando un análisis crítico de la bibliografía y confeccionando un proyecto de investigación que fue presentado a la Fundación para la Investigación en Urología y la Sociedad Urológica Madrileña. Estas entidades financiaron totalmente el estudio al considerarlo un proyecto viable y realizable.

Quiero destacar que se trata de un estudio original de investigación que se ha podido llevar a cabo de forma multicéntrica entre dos Servicios de Urología (Hospital Clínico San Carlos y Hospital del Leganés), la Unidad de Genómica y Biología Molecular del Servicio de Análisis Clínicos (Hospital Clínico San Carlos) y la Unidad de Apoyo a la Investigación del Hospital Clínico San Carlos. Los objetivos son claros y concisos. El diseño del estudio, metodología y análisis estadístico impecables. Los procedimientos estadísticos descritos en material y métodos son los que aparecen reflejados en los resultados y los gráficos son de fácil interpretación. Estos resultados son claros y

concisos y aplicables a la práctica clínica diaria. Las conclusiones están basadas en los resultados obtenidos, que son claros y concisos y responden a los objetivos planteados.

**Por tanto, considero que este trabajo reúne todos los requisitos para ser presentado ante el tribunal calificador y poder optar al grado de doctor.**

*Madrid, a 28 de Septiembre de 2015*

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jesús Moreno Sierra', with a long horizontal stroke extending to the right.

***Fdo.: Jesús Moreno Sierra***

*Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.*



## Informe del Director de la Tesis Doctoral

<b>DATOS DE LA TESIS DOCTORAL</b>	
<b>Nombre del Doctorando</b>	<i>Silvia García Barreras</i>
<b>Título de la Tesis</b>	<b><i>POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA CALICREÍNA HUMANA 2 (KLK2) Y EL DESARROLLO DE CÁNCER DE PRÓSTATA. RELACIÓN CON LA PROTEÍNA GLANDULAR HUMANA 2(HK2) Y LAS FORMAS LIBRE, TOTAL Y LIGADA DEL PSA</i></b>
<b>Facultad o Centro</b>	<i>Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid</i>

<b>DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL</b>	
<b>Nombre Completo</b>	<i>Miguel Téllez Martínez Fornés</i>
<b>Centro al que pertenece y dirección</b>	<i>Hospital Universitario Severo Ochoa</i>
<b>D.N.I/Pasaporte</b>	<i>02527658G</i>
<b>e-mail</b>	<i>miguetellez@hotmail.com</i>

	<b>VALORACIÓN DE LA TESIS</b>			
	<i>Muy Buena</i>	<i>Buena</i>	<i>Suficiente</i>	<i>Deficiente</i>
<b>Originalidad</b>	<i>X</i>			
<b>Definición Objetivos</b>	<i>X</i>			
<b>Metodología</b>	<i>X</i>			
<b>Relevancia Resultados</b>	<i>X</i>			
<b>Discusión / Conclusiones</b>	<i>X</i>			

**INFORME** (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

El trabajo de investigación aborda un tema de gran actualidad: el diagnóstico precoz del cáncer de próstata.

El antígeno prostático específico (PSA) es el marcador tumoral más utilizado para la detección del cáncer de próstata. La extendida aplicación del PSA resulta en un aumento del número de biopsias transrectales, muchas de ellas con resultado benigno, que podrían haberse evitado, disminuyendo costes y efectos secundarios. El PSA no es específico del cáncer de próstata, por lo que su elevación no siempre significa que exista cáncer de próstata.

Se han identificado números loci asociados con la susceptibilidad de padecer cáncer de próstata. Tres loci contienen genes que codifican la mayor cantidad de productos secretores de la próstata: KLK (que codifica la calicreína hK2), KLK3 (codifica el antígeno prostático específico) y MSMB en el cromosoma 10.

Algunos estudios sugieren la existencia de una relación entre los polimorfismos presentes en estos genes y el riesgo de padecer cáncer de próstata.

El objetivo principal es analizar la relación entre el polimorfismo C/T rs 198977 del gen KLK2, los niveles en sangre de la proteína hK2 y las formas libre, total y ligada del PSA con el diagnóstico de adenocarcinoma de próstata en la biopsia transrectal.

La metodología de la investigación, estudio prospectivo de cohorte única, es la correcta y se ha seguido el diseño previsto desde el inicio.

La elección de los pacientes ha sido rigurosa y acorde con los criterios clínicos bien fundamentados, lo que aumenta la relevancia de los resultados estudio.

Los resultados son acordes con otros trabajos anteriormente publicados, hecho de gran relevancia para su aplicación clínica.

Las conclusiones se ajustan a los resultados, confirmando la hipótesis inicial y abriendo una línea de investigación de interés para el diagnóstico precoz del cáncer de próstata.

En conclusión, esta tesis doctoral está preparada para su defensa pública ante el tribunal.

*Madrid, a 2 de Octubre de 2015*



***Fdo.: Miguel Téllez Martínez-Fornés***

*Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.*



## Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Silvia García Barreras
Título de la Tesis	<b>POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA CALICREÍNA HUMANA 2 (KLK2) Y EL DESARROLLO DE CÁNCER DE PRÓSTATA. RELACIÓN CON LA PROTEÍNA GLANDULAR HUMANA 2(HK2) Y LAS FORMAS LIBRE, TOTAL Y LIGADA DEL PSA</b>
Facultad o Centro	Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	Silvia Veganzones de Castro
Centro al que pertenece y dirección	Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos. C/Martín Lagos sn, planta 4, ala Sur. 28040 Madrid
D.N.I/Pasaporte	78902565F
e-mail	silvia_veg@yahoo.es

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos		X		
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

**INFORME** (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

La tesis doctoral presentada por Silvia García Barreras reúne a mi juicio los requisitos necesarios para ser defendida. El trabajo que recopila ha sido realizado con rigor, la metodología es adecuada y las conclusiones responden a los objetivos planteados. La presentación de los resultados es impecable y es buen reflejo del cuidado y esfuerzo que conlleva el trabajo que se discute. La bibliografía es amplia, actualizada y da prueba del dominio del campo de la doctoranda.

**Por todo ello, considero que la presente tesis reúne todos los requisitos de calidad y relevancia para su admisión a trámite y posterior defensa pública.**

Madrid, a 5 de Octubre de 2015

**Fdo.:** Silvia Veganzones de Castro

*Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.*



*A Peter*



## **AGRADECIMIENTOS**

---



Mi agradecimiento más profundo y sentido a mi familia, a mis padres y a mí hermano Carlos por su apoyo y cariño incondicionales. A mi marido Peter por su paciencia, honestidad y generosidad; sin su apoyo y confianza este trabajo hubiera sido menos gratificante.

Quiero extender mi sincero agradecimiento a Miguel Téllez, Jesús Moreno y Silvia Veganzones, directores de este trabajo, por el interés y ayuda que me han prestado en el desarrollo de esta Tesis, sus importantes aportaciones, y su apoyo en mi trabajo. No cabe duda de que su participación ha enriquecido el trabajo realizado.

Gracias a Luis Fiter, de paciencia infinita, que deposito su confianza en mí, y posibilito que este proyecto diera sus primeros pasos. A Alberto Herrero por compartir generosamente sus extensos conocimientos conmigo y por su incondicional dedicación a los pacientes afectados de patología prostática. A mis compañeros de residencia Noelia, Jorge, Juan, Miguel Ángel y Geraldine por ayudarme con la recogida de muestras y que contribuyen a que la unidad de urología sea un sitio más humano.

Gracias a Concepción García Lacalle, que desde antes del inicio de este proyecto me ayudo con una sonrisa e infinita paciencia a entender el complejo funcionamiento de un laboratorio. Su orden y minuciosidad se refleja también en este trabajo.

A Marisa Maestro y a sus colaboradoras Virginia y Beatriz de la Unidad de Genómica del Hospital Clínico, mi profunda gratitud por su inestimable y generosa ayuda en la determinación de los polimorfismos. Por ayudarme a comprender estas técnicas tan desconocidas para los urólogos, y por su buen hacer y profesionalidad. Sus ganas de trabajar y su determinación han marcado este trabajo.

Por su paciencia, su bondad y su generosidad, quedo inmensamente agradecida a Cristina Fernández, de la Unidad de Investigación Clínica del Hospital Clínico, que me ayudo en los complejos análisis estadísticos aportando luz y coherencia en los momentos más decisivos.

A Jose Miguel Cárdenas y Fernando Vidal Vanaclocha por su orientación, disponibilidad y apoyo en mi trabajo.

Mi agradecimiento más sincero a todos los pacientes, sin cuya colaboración nada de esto tendría sentido.

# Índice General

---

AGRADECIMIENTOS .....	13
RESUMEN .....	21
SUMMARY .....	31
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>41</b>
<b>1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA .....</b>	<b>43</b>
<b>1.2 FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA .....</b>	<b>49</b>
1.2.1 INFLUENCIAS GENÉTICAS Y FAMILIARES.....	49
1.2.2 EDAD.....	50
1.2.3 GEOGRAFÍA Y ETNIA .....	51
1.2.4 DIETA .....	51
1.2.5 VITAMINA D.....	52
<b>1.3 QUIMIOPREVENCIÓN .....</b>	<b>53</b>
<b>1.4 PAPEL E INFLUENCIA DE LOS ANDRÓGENOS .....</b>	<b>55</b>
1.4.1 ANDRÓGENOS Y 5 ALFA REDUCTASA .....	55
1.4.2 RECEPTOR ANDROGÉNICO.....	58
1.4.3 CARCINOGENESIS .....	64
<b>1.5 DIAGNÓSTICO PRECOZ .....</b>	<b>66</b>
1.5.1 TACTO RECTAL.....	68
1.5.2 PSA .....	68
1.5.2.1 Densidad PSA .....	70
1.5.2.2 Velocidad del PSA.....	71
1.5.2.3 Formas moleculares del PSA .....	71
<b>1.6 BIOMARCADORES .....</b>	<b>74</b>
1.6.1 CALICREINA HUMANA 2.....	75
1.6.2 BIOMARCADORES DEL CICLO CELULAR.....	80
1.6.3 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA APOPTOSIS .....	80
1.6.4 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA SEÑAL DE TRANSDUCCIÓN .....	81
1.6.5 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA ADHESIÓN CELULAR .....	81
1.6.6 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA ANGIOGÉNESIS .....	82
1.6.7 CONTAJE DE CELULAS TUMORALES CIRCULANTES .....	82
1.6.8 CITOGENÉTICOS.....	82
1.6.8.1 Gen fusión <i>TMPRSS2</i> con genes <i>ETS</i> para factores de transcripción .....	83
1.6.8.2 Hipermetilación de la glutatión s-transferasa .....	84
1.6.8.3 Polimorfismos genéticos.....	84
<b>1.7 BIOPSIA DE PRÓSTATA Y TÉCNICAS DE IMAGEN.....</b>	<b>89</b>

1.7.1	BIOPSIA DE PRÓSTATA GUIADA POR ECOGRAFÍA .....	89
1.7.2	NUEVAS TÉCNICAS DE IMAGEN.....	94
1.7.2.1	Elastografía .....	94
1.7.2.2	Ecografía transrectal asistida por ordenador: histoscanning y c-trus/anna 96	
1.7.2.3	Resonancia magnética .....	97
<b>1.8</b>	<b>HISTOPATOLOGÍA.....</b>	<b>104</b>
1.8.1	PIN DE ALTO GRADO.....	105
1.8.2	PROLIFERACIÓN ACINAR ATÍPICA (ASAP) .....	107
1.8.3	ATROFIA PROLIFERATIVA INFLAMATORIA (P.I.A) .....	108
1.8.4	ADENOCARCINOMA .....	110
<b>1.9</b>	<b>FACTORES PRONÓSTICOS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.....</b>	<b>115</b>
1.9.1	GRADO DE GLEASON EN LA BIOPSIA .....	115
1.9.2	EXTENSIÓN EXTRAPROSTÁTICA .....	115
1.9.3	VOLUMEN TUMORAL .....	117
1.9.4	MARGEN QUIRÚRGICO .....	117
1.9.5	PSA .....	118
1.9.6	INVASIÓN VESÍCULAS SEMINALES.....	118
1.9.7	MESTÁSTASIS EN NÓDULOS LINFÁTICOS.....	119
<b>1.10</b>	<b>MODELOS PRONÓSTICOS/GRUPOS DE RIESGO .....</b>	<b>119</b>
<b>1.11</b>	<b>TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.....</b>	<b>121</b>
1.11.1	CÁNCER DE PRÓSTATA LOCALIZADO T1-T2C .....	121
1.11.2	CÁNCER DE PRÓSTATA LOCALMENTE AVANZADO T3-T4 N0-N1 .....	123
1.11.3	CÁNCER DE PRÓSTATA METASTÁSICO M+ .....	123
1.11.4	CÁNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE A CASTRACIÓN .....	125
<b>2</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>127</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>131</b>
3.1	OBJETIVO PRINCIPAL .....	133
3.2	OBJETIVOS SECUNDARIOS .....	133
<b>4</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>135</b>
4.1	DISEÑO DEL ESTUDIO Y PACIENTES .....	137
4.2	PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO .....	142
4.3	PROCESAMIENTO DE MUESTRAS .....	145
4.3.1	DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.....	145
4.3.2	ANÁLISIS GENÉTICO DEL POLIMORFISMO rs 198977 C/T DE <i>KLK2</i> .....	149
4.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	154

<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>155</b>
<b>5.1</b>	<b>DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA COHORTE .....</b>	<b>157</b>
5.1.1	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y FACTORES DE RIESGO.....	157
5.1.2	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y ECOGRÁFICAS DE LA GLÁNDULA PROSTÁTICA .....	157
5.1.3	CARACTERÍSTICAS DE LA BIOPSIA TRANSRECTAL.....	160
5.1.4	ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS VALORES DE LAS CALICREINAS GLANDULARES HUMANAS.....	160
5.1.5	DISTRIBUCIÓN DEL POLIMORFISMO EN LA POBLACIÓN A ESTUDIO .....	162
5.1.6	CARACTERÍSTICAS DE LOS TUMORES .....	162
5.1.7	TIPOS DE TRATAMIENTO .....	167
<b>5.2</b>	<b>ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO CON EL RESULTADO DE LA BIOPSIA DE PRÓSTATA .....</b>	<b>170</b>
5.2.1	ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS CON EL RESULTADO DE LA BIOPSIA .....	170
5.2.1.1	Antecedentes personales y factores de riesgo .....	170
5.2.1.2	Características ecográficas y clínicas de la glándula prostática .....	173
5.2.2	ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LAS CALICREINAS CON EL RESULTADO DE LA BIOPSIA .....	175
5.2.2.1	Formas moleculares del PSA .....	175
5.2.2.2	Proteína hk2 y combinaciones de calicreinas.....	177
5.2.3	ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LAS VARIABLES GENÉTICAS CON EL RESULTADO DE LA BIOPSIA .....	179
5.2.3.1	Análisis genotípico:.....	179
5.2.3.2	Análisis alélico: .....	180
<b>5.3</b>	<b>ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LAS VARIABLES GENÉTICAS Y LA PROTEÍNA HK2 CON LOS PARÁMETROS CLÍNICO PATOLÓGICOS. ....</b>	<b>180</b>
5.3.1	POLIMORFISMO C/T 198977 .....	180
5.3.2	PROTEÍNA HK2 Y SU CORRELACIÓN CON PSA TOTAL Y PSA LIBRE .....	186
<b>5.4</b>	<b>ANÁLISIS ESTRATIFICADO DE LAS VARIABLES GENÉTICAS Y PROTEÍNA HK2 201</b>	
5.4.1	ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO C/T rs 198977 Y LOS ALELOS CON EL RESULTADO DE LA BIOPSIA, ESTRATIFICADO POR LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS.....	201
5.4.2	ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA HK2 CON EL RESULTADO DE LA BIOPSIA, ESTRATIFICADO POR LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS. ....	208
<b>5.5</b>	<b>ANÁLISIS MULTIVARIABLE Y BENEFICIO NETO.....</b>	<b>212</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>217</b>

6.1	DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE LOS FACTORES DE RIESGO DE CP, Y DEL POLIMORFISMO GENÉTICO C/T RS 198977 DEL GEN <i>KLK2</i> . CONCENTRACIONES EN SUERO DE LA PROTEÍNA HK2, PSA Y FORMAS MOLECULARES. ....	222
6.2	RELACION DE LOS FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA, PROTEÍNA HK2, PSA Y FORMAS MOLECULARES, Y POLIMORFISMO GENÉTICO C/T RS 198977 DEL GEN <i>KLK2</i> CON EL RESULTADO DE LA BIOPSIA DE PROSTATA....	233
6.3	RELACIÓN DEL POLIMORFISMO C/T RS 198977, LOS ALELOS C Y T, Y LA PROTEÍNA HK2 CON LAS VARIABLES CLÍNICO PATOLÓGICAS DEL ESTUDIO .....	244
6.4	DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS ESTRATIFICADO DE LAS VARIABLES GENÉTICAS (POLIMORFISMO C/T RS 198977 Y ALELOS), Y PROTEÍNA HK2.....	256
6.5	MODELO PREDICTIVO .....	263
7	CONCLUSIONES .....	269
8	BIBLIOGRAFÍA.....	273
9	ABREVIATURAS .....	305
10	ANEXOS.....	311
	ANEXO 1.....	313
	ANEXO 2.....	317
	ANEXO 3.....	325

## RESUMEN

---



## INTRODUCCIÓN

---

El cáncer de próstata es uno de los tumores más prevalentes en España y uno de los más frecuentemente diagnosticados en el mundo desarrollado.

Se trata de un tumor que progresa de manera indetectable y, en muchas ocasiones, las manifestaciones clínicas sólo aparecen cuando la enfermedad es sistémica. Por lo tanto, se trata de un importante problema de salud pública ante el cual se han desarrollado programas de cribado para el diagnóstico precoz. El antígeno prostático específico (PSA) es el marcador tumoral más utilizado para la detección del cáncer de próstata. Sin embargo, la extendida aplicación del PSA como screening ha derivado en un aumento del número de biopsias transrectales muchas de ellas con resultado benigno y que por tanto podrían haberse evitado con el correspondiente ahorro de costes y efectos secundarios. El PSA no es específico del cáncer de próstata y pese a que se considere un marcador tumoral efectivo y órgano específico, su aumento no siempre significa que exista cáncer de próstata. Por esta razón, se han desarrollado múltiples parámetros diagnósticos que, basados en el PSA, mejoran la especificidad en la detección precoz de cáncer de próstata. Los principales parámetros son la densidad del PSA, velocidad del PSA y las formas moleculares del PSA (libre, total y ligado)

Varios estudios han analizado el papel de la glicoproteína hK2 en el diagnóstico de cáncer de próstata. Es una proteasa sérica perteneciente a la misma familia del PSA. Comparten un 80% de secuencia, ambas se expresan en el epitelio prostático y están presentes en el suero y líquido seminal. Usado en combinación con el PSA libre y total se puede obtener una mejor diferenciación entre la hiperplasia benigna de próstata y el cáncer. También se ha identificado en varios trabajos que la hK2 puede asociarse a peor diferenciación tumoral, extensión extracapsular y recidiva bioquímica en pacientes operados mediante prostatectomía radical.

Actualmente se ha desarrollado un modelo estadístico que puede mejorar la capacidad predictiva del PSA total combinando PSA libre, total y ligado junto a hK2, en pacientes con reciente screening de PSA. El uso de este modelo podría reducir sustancialmente el número de biopsias de próstata innecesarias.

El cáncer de próstata tiene un marcado componente hereditario, con un 42% de probabilidad de herencia. Se han identificado numerosos loci asociados con la susceptibilidad de padecer cáncer de próstata. Existen 7 loci relacionados, en los cromosomas 3, 6, 7q, 8q24, 10, 11 y 19. Además tres de los loci identificados, contenían genes que codificaban la mayor cantidad de productos secretores de la próstata. Estos genes son KLK (que codifica la calicreína hK2), KLK3 (codifica el antígeno prostático específico), y MSMB que codifica la beta microseminoproteína. Los dos primeros se encuentran en el cromosoma 19 y el MSMB en el cromosoma 10. Algunos estudios sugieren la existencia de una relación entre los polimorfismos presentes en estos genes y el riesgo de padecer cáncer de próstata. Estos loci explican aproximadamente el 15% del riesgo familiar de cáncer de próstata.

Recientemente un grupo de trabajo ha identificado una asociación más potente entre el polimorfismo rs 198977 en el gen KLK2 y el cáncer de próstata, añadiendo los niveles de hK2 como factor independiente. Este estudio sugiere que la habilidad de un marcador para predecir cáncer se incrementa si se conoce el polimorfismo presente en el gen y viceversa.

Son necesarios más estudios que examinen el grado en el que la evaluación de estos polimorfismos incrementa la precisión diagnóstica del PSA y otras calicreínas medidas en sangre, como marcadores predictivos de cáncer de próstata.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

La hipótesis del estudio supone la existencia de una relación entre padecer cáncer de próstata y presentar el polimorfismo C/T rs 198977 del gen KLK2, considerando los niveles séricos de la proteína hK2 como factor independiente, en pacientes con criterios de cribado poblacional positivo para cáncer de próstata.

Así mismo supone la existencia de una asociación entre el polimorfismo C/T rs 198977 y el % PSA libre/total.

La presente tesis doctoral se ha diseñado con un objetivo principal y tres secundarios bien definidos.

### ***OBJETIVO PRINCIPAL***

Analizar la relación entre el polimorfismo C/T rs 198977 del gen KLK2 , los niveles en sangre de la proteína hK2 y las formas libre, total y ligada del PSA con el diagnóstico de adenocarcinoma de próstata en la biopsia transrectal.

### ***OBJETIVOS SECUNDARIOS***

1. Analizar si existe relación entre la frecuencia genotípica del polimorfismo C/T rs 198977 y la proteína hK2.
2. Analizar la relación de los niveles de la proteína hK2 y el polimorfismo C/T rs198977 con los parámetros clínicos utilizados en la práctica habitual (edad, tacto rectal, tipo histológico, grupo pronóstico, estadio clínico, hallazgos ecográficos y formas moleculares del PSA)
3. Crear un modelo matemático predictivo del resultado de la biopsia prostática transrectal, en pacientes con cribado positivo para cáncer de próstata, combinando 4 caliceínas: PSA libre, total, ligado y hK2, además de la edad y el tacto rectal. Con este modelo se podría disminuir el número de biopsias prostáticas innecesarias y las complicaciones asociadas a este procedimiento.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Se trata de un estudio de cohorte única prospectiva unicéntrica. Consta de un total de 419 pacientes atendidos en las consultas de urología del Hospital Universitario Severo Ochoa, que cumplían criterio de realización de biopsia prostática según protocolos de cribado poblacional del centro hospitalario, basados en las actuales guías europeas. Estos criterios de inclusión fueron: tacto rectal sospechoso, PSA alterado según grupos de edad y anatomía previa de ASAP/PINAG.

A todos los pacientes previamente a la realización de la biopsia se les extrajo 3 muestras de sangre periférica. Dos tubos con EDTA para las mediciones de las formas moleculares del PSA (total, libre y ligado), y extracción del ADN para la identificación del polimorfismo rs 198977, y otro tubo con separador de gelosa de 5ml para obtener suero y medir la proteína hK2.

A todos los pacientes se les realizó una encuesta en la que se recogía información sobre diferentes cuestiones relativas a sus antecedentes clínicos personales, demográficos y sintomatología.

Posteriormente a la extracción de sangre se procedió a la realización del tacto rectal, ecografía y biopsia de próstata transrectal con sedación anestésica.

Se evaluó la asociación del polimorfismo y la proteína hK2 con el resultado de la biopsia y se ajustó un modelo de regresión logística para predecir cáncer de próstata. Se construyó la curva ROC del modelo evaluándola con su área bajo la curva (AUC) y su Intervalo de confianza (IC 95%) con las variables significativas con respecto a resultado de biopsia. Se han usado análisis de curvas de decisión que estiman el beneficio neto para modelos de predicción

## RESULTADOS

---

Los resultados más relevantes obtenidos en el presente estudio se resumen a continuación.

### *ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LA PROTEINA HK2 Y EL POLIMORFISMO C/T RS 198977 CON EL RESULTADO DE LA BIOPSIA.*

No se ha encontrado asociación significativa entre la proteína hK2 y el cáncer de próstata ( $p=0,146$ ) La media de hK2 en suero es más elevada en los pacientes con cáncer (0,08 vs 0,06 ng/dl)

Con respecto a los cocientes que relacionan hK2 y las formas moleculares del PSA, cuando hK2/PSA total es menor de 0,29 y hK2x PSA total/libre es mayor de 0,59, se obtiene una mayor proporción de tumores (48,1% y 41,6%) siendo una relación significativa ( $p < 0,001$  y  $p=0,012$ )

La relación entre los genotipos del polimorfismo C/T rs 198977 y el resultado de la biopsia de próstata no mostró asociación significativa ( $p=0,544$ ) Los pacientes con genotipo TT tienen una concentración media de hK2 de 0,05 ng/dl que es más baja que en los genotipos CC y CT.

### *ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LA PROTEINA HK2 Y EL POLIMORFISMO C/T RS 198977 CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DEL ESTUDIO*

El polimorfismo C/T rs 198977 se relaciona significativamente con los grados de tacto rectal ( $p = 0,004$ ), con un 47,8% de pacientes con genotipo CC si el tacto rectal es II/IV.

Con respecto a la proteína hK2 el 53,8% de los pacientes con concentraciones mayores de 0,08 ng/dl tienden a tener márgenes positivos en la pieza de prostatectomía radical ( $p=0,071$ )

En el estudio de la asociación del cociente hK2/PSA total con respecto a las diferentes variables clínico patológicas se ha demostrado que cuando es menor de 0,29 se relaciona significativamente con tumores de próstata locamente avanzados (borramiento, induración, nódulo palpable al tacto, estadio clínico > T3a), de peor pronóstico (56 % con riesgo elevado de D'Amico), con Gleason mayor de 8 (70%) y afectación extensa de los cilindros prostáticos de la biopsia (54%)

#### ***ANÁLISIS ESTRATIFICADO DEL POLIMORFISMO C/T 198977 Y DE LA PROTEINA HK2.***

En el análisis de la asociación entre el polimorfismo C/T rs 198977 y el resultado de la biopsia de próstata al estratificar en función de la concentración sérica de hK2, cuando es menor de 0,03 se obtiene una relación significativa ( $p=0,015$ ) debido a que el 50 % de los pacientes con genotipo TT tiene biopsia positiva.

Con respecto a la relación entre la proteína hK2 y la biopsia de próstata estratificada por el consumo abundante de grasas, se observó significación estadística en el grupo de consumo abundante de grasas ( $p=0,007$ ) En este grupo dentro de los pacientes con hK2 igual a 0,03 es más frecuente tener una biopsia negativa (66,2%)

#### ***ANÁLISIS MULTIVARIABLE Y BENEFICIO NETO***

Se desarrollaron 5 modelos matemáticos predictivos de cáncer de próstata. El modelo basal (edad, PSA total y tacto rectal sospechoso) obtuvo un AUC de 0,73. En el modelo clínico se incluyó además de las variables del modelo basal, el volumen glandular y la historia familiar de cáncer de próstata consiguiendo un AUC de 0,83. Los tres modelos experimentales que combinaban las variables del modelo clínico junto a la proteína hK2, cociente hK2/PSA total y polimorfismo rs 198977, no aumentan la capacidad predictiva de cáncer de próstata obteniendo un AUC de 0,83.

Para los modelos clínico y experimentales el beneficio neto que se obtiene para una probabilidad de cáncer de próstata del 29% es mayor que el del modelo basal. Con los modelo clínico y experimentales se conseguiría una reducción del 11,3% en

biopsias de próstata innecesarias para diagnosticar el mismo número de tumores de próstata.

## CONCLUSIONES

---

1. La concentración en suero de la proteína hK2 es más elevada en los varones con cáncer de próstata.
2. En pacientes sometidos a prostatectomía radical, a mayor concentración de hK2, mayor probabilidad de que existan márgenes positivos.
3. El cociente hK2xPSA total/libre se relaciona significativamente con el cáncer de próstata. El cociente hK2/PSA total se relaciona con tumores de próstata de peor pronóstico.
4. En el presente trabajo no se ha podido demostrar la relación entre el polimorfismo C/T rs 198977 del gen KLK2 con el riesgo de padecer cáncer de próstata ni con la proteína hK2 y las formas moleculares del PSA.
5. Los pacientes con genotipo TT tienen niveles séricos de hK2 bajos, obteniendo un valor medio de 0,05 ng/dl.
6. El genotipo TT se relaciona significativamente con un resultado positivo en la biopsia cuando la concentración sérica de hK2 es menor de 0,03 ng/dl.
7. La aplicación de un modelo matemático predictivo que combine variables clínicas consigue aumentar el área bajo la curva hasta 0,83. Añadir al modelo clínico parámetros como la proteína hK2, hK2/PSA total o polimorfismo rs 198977 no aumenta la capacidad predictiva de cáncer prostático.
8. El uso de modelos predictivos clínicos podrían reducir el número de biopsias prostáticas innecesarias.



## SUMMARY

---



## INTRODUCTION

---

Prostate cancer is one of the most prevalent tumors in Spain and one of the most frequently diagnosed in the developed world.

This is a tumor that progresses from undetectable way and, in many cases, the clinical manifestations appear only when the disease is systemic. Therefore, it is a major global public health problem, to which have been developed screening programs for early diagnosis. Prostate specific antigen (PSA) is the most widely used tumor marker for prostate cancer detection. However, widespread implementation of PSA screening has resulted in an increased number of unnecessary transrectal biopsies. The PSA is not specific for prostate cancer and even though a tumor marker specific organ cash and considered, the increase does not always mean there is prostate cancer. Therefore, we have developed multiple diagnostic parameters, based on PSA, to improve specificity in the early detection of prostate cancer. The main parameters are the PSA density, PSA velocity and PSA molecular forms (free, total and unbound)

Several studies have examined the role of glycoprotein hK2 in the diagnosis of prostate cancer. It is one belonging to the same family of serine protease PSA. Share 80% sequence, both are expressed in the prostate epithelium and are present in serum and seminal fluid .Used in combination with the free and total PSA can get a better differentiation between benign prostatic hyperplasia and cancer. It has also been identified in several studies that hK2 can predict worse tumor differentiation, extracapsular extension and biochemical recurrence in patients undergoing radical prostatectomy.

It has now been developed a statistical model that can predict the outcome of the biopsy combining free, total and intact PSA with hK2 in patients with recent PSA screening. Using this model could substantially reduce the number of unnecessary prostate biopsies.

Prostate cancer has a strong genetic component, with a 42% chance of inheritance. We have identified several loci associated with susceptibility for prostate cancer. There are seven related loci in chromosomes 3, 6, 7q, 8q24, 10, 11 and 19. Furthermore, three of the loci identified, containing genes encoding as many prostate secretory products. These genes are KLK 2 (encoding kallikrein hK2), KLK3 (encoding the prostate specific antigen) (12), and MSMB microseminoprotein encoding beta (13) The first two are on chromosome 19 and MSMB in 10 chromosome.

Studies spoke of a relationship between polymorphisms in these genes and the risk of prostate cancer. However these loci account for approximately 15% of the familial risk of prostate cancer.

Recently a working group has identified a strong association between the polymorphism rs 198977 in KLK2 gene and prostate cancer, adding hK2 levels as an independent factor. This study suggests that the ability of a marker for predicting cancer increases if this polymorphism in the gene is known and vice versa.

More studies examining the degree to which the evaluation of genotype on these polymorphisms increase accuracy of PSA and other kallikrein measured in blood, as a predictive marker of prostate cancer are needed.

## HYPOTHESES AND OBJECTIVES

---

The study hypothesis assumed the existence of a relationship between developing prostate cancer and present polymorphism C / T rs 198977 of KLK2 gene considering serum hK2 protein as an independent factor, in patients with positive population screening criteria for cancer prostate.

Also assumed there was an association between the polymorphism C / T rs 198977 and % free / total PSA.

This thesis was designed with one main objective and well-defined three secondary objectives.

### ***MAIN OBJETIVE***

Analyze the relationship between the polymorphism C / T rs 198977 of KLK2 gene, blood levels of hK2 protein and free, total and bound forms of PSA with the diagnosis of prostate adenocarcinoma in the transrectal biopsy.

### ***SECONDARY OBJECTIVES***

1. To analyze the correlation between the genotype frequency of polymorphism C / T rs 198977 and hK2 protein.
2. To analyze the relationship between hK2 protein levels and polymorphism C / T rs 198977 with clinical parameters used in routine practice (age, digital rectal examination, histological type, prognosis group, clinical stage, sonographic findings and molecular forms of PSA )
3. Create a predictive mathematical model of the result of transrectal prostate biopsy in patients with positive screening for prostate cancer, combining four kallikreins: free PSA, total, bound and hK2, besides age and rectal examination. This model could reduce the number of unnecessary prostate biopsies and the complications associated with this procedure.

## **MATERIAL AND METHODS**

---

It is a prospective cohort study of only one center. It comprises a total of 419 patients treated in the urology at University Hospital Severo Ochoa, who met some of the criteria for performing prostate biopsy as mass screening protocols of the hospital, based on current European guidelines. These criteria were: Suspicious DRE, PSA altered by age group and prior anatomy of ASAP / HGPIN.

In all prior to performing the biopsy patients were extracted 3 peripheral blood tubes. Two with EDTA for measurements of the molecular forms of PSA (total, free and bound), and DNA extraction for identification of polymorphism rs 198977, and on the other with separator 5ml agar for measuring serum and hK2 protein.

All patients also underwent a survey of information on various issues related to their personal, demographic and medical history symptoms.

The blood collection and analytical procedures were done after the realization of the digital rectal examination, transrectal ultrasound and prostate biopsy with anesthetic sedation.

We have evaluated the association of the hK2 protein and polymorphism with the result of the biopsy and a logistic regression model was fitted to predict prostate cancer. We have built a ROC curve model with the area under the curve (AUC) and confidence intervals (95%) with significant variables regarding biopsy result. We have used decision curve analysis to estimate the net benefit to prediction models.

## RESULTS

---

The most relevant results obtained in this study are summarized below:

### *STUDY OF THE RELATIONSHIP OF PROTEIN HK2, AND POLYMORPHISM C / T 198977 WITH THE RESULT OF THE BIOPSY.*

No significant association was found between the hK2 protein and prostate cancer ( $p= 0.146$ ) Mean serum hK2 is higher in cancer patients (0.08 vs 0.06 ng / dl)

Regarding ratios relating hK2 and PSA molecular forms when hK2 / total PSA is less than 0.29 and hK2x total / free PSA is more than 0.59, a larger proportion of tumors is obtained (48.1 % and 41.6%) being a significant relationship ( $p < 0.001$  and  $p = 0.012$ )

The relationship between polymorphism genotypes C / T rs 198977 and the result of the biopsy showed no significant association ( $p = 0.544$ ) TT genotype patients have an average concentration of hK2 0.05 ng / dl that is lower than in the CC and CT genotypes.

***STUDY OF THE RELATIONSHIP OF PROTEIN HK2, AND POLYMORPHISM C / T 188977 WITH CLINICOPATHOLOGICAL STUDY VARIABLES***

Polymorphism C / T 198977 is significantly related to the degree of rectal examination ( $p = 0.004$ ) In patients with a rectal exam grade II / IV it is more common to have a CC (47.8%) genotype.

Regarding the hK2 protein , 53.8% of patients with higher concentrations of 0.08 ng / dl tend to have positive margins in radical prostatectomy specimen ( $p = 0.071$ )

The study of the association ratio hK2 / total PSA with respect to different clinicopathological variables has desmostrated that when it is less than 0.29 ng / dl is significantly related to locally advanced prostate tumors (effacement, induration, palpable nodule to touch, clinical stage > T3a), worse prognosis (56 % high risk of D'Amico), higher Gleason 8( 70%) and extensive involvement of prostate biopsy cores (54%)

***STRATIFIED ANALYSIS OF POLYMORPHISM C / T 198977 AND PROTEIN HK2.***

In the analysis of the association between polymorphism rs 198977 C / T and outcome of prostate biopsy when stratified according to serum hK2, when it is less than 0.03 significant relationship is obtained ( $p = 0.015$ ) due to patients with TT genotype, 50% had positive biopsy.

With regard to the relationship between hK2 protein and prostate biopsy stratified by heavy consumption of fats, statistical significance was observed in the group of rich fat intake ( $p = 0.007$ ) In this group of patients within hK2 equal to 0.03 it is more common to have a negative biopsy (66.2%)

## *MULTIVARIATE ANALYSIS AND NET BENEFIT*

5 predictive mathematical models of prostate cancer were developed. The baseline model (age, total PSA and DRE suspicious) obtained an AUC of 0.73. In the clinical model is also included in the baseline model variables, the glandular volume and family history of prostate cancer getting an AUC of 0.83. The three experimental models combining clinical model variables with hK2 protein, ratio hK2 / total PSA and polymorphism rs 198977, do not increase the predictive accuracy of prostate cancer obtaining an AUC of 0.83.

For clinical and experimental models, the net benefit obtained when the probability of prostate cancer is 29% , is higher than the baseline model. With clinical and experimental models we get a 11.3% reduction in unnecessary biopsies to diagnose the same number of prostate tumors.

## CONCLUSIONS

---

1. The serum concentration of the hK2 protein is higher in men with prostate cancer.
2. In patients undergoing radical prostatectomy, the higher the concentration of hK2, the more likely that there are positive margins.
3. The total / free hK2xPSA ratio is significantly related to prostate cancer. The ratio hK2 / total PSA is related to prostate tumors of worse prognosis.
4. In this work it has not been able to demonstrate the relationship between the polymorphism C / T gene KLK2 rs 198977 of the risk of prostate cancer or with the hK2 protein and molecular forms of PSA.
5. Patients with TT genotype had lower serum levels of hK2 than patients with CC genotype, obtaining an average value of hK2 0.05 ng / dl.
6. The TT genotype is significantly associated with positive biopsy when serum hK2 level is less than 0.03 ng / dl.

7. Implementation of a predictive mathematical model that combines clinical variables increases the area under the curve until 0.83. Add to clinical parameters as the hK2 protein model, hK2 / total PSA or rs 198977 polymorphism does not increase the predictive accuracy of prostate cancer.
8. The clinical use of predictive models may reduce the number of unnecessary prostate biopsies.



# 1 INTRODUCCIÓN

---



## 1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata es uno de los tumores más prevalentes en España y uno de los más frecuentemente diagnosticados en el mundo desarrollado.<sup>1, 2</sup>

Según publica el último informe de Globocan 2012<sup>3</sup>, por parte de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) que forma parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>4</sup>, y considerada la principal fuente de información mundial, el cáncer de próstata es la segunda neoplasia más frecuente en hombres. Globocan 2012 ofrece una importante visión sobre el cáncer: estima que 1.1 millón de hombres en todo el mundo serán diagnosticados de cáncer de próstata, correspondiendo un 70 % de los casos (759,000) a regiones desarrolladas.

([http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx))

La incidencia de cáncer de próstata varía en función de la localización geográfica (Figura 1-1) Las tasas son mayores en Australia/Nueva Zelanda, Norte América y Oeste y Noreste de Europa, con tasas estandarizadas por edad de 111.6, 97.2, 96.3 y 87 casos por cada 100.000 habitantes por año respectivamente.<sup>3,4</sup>

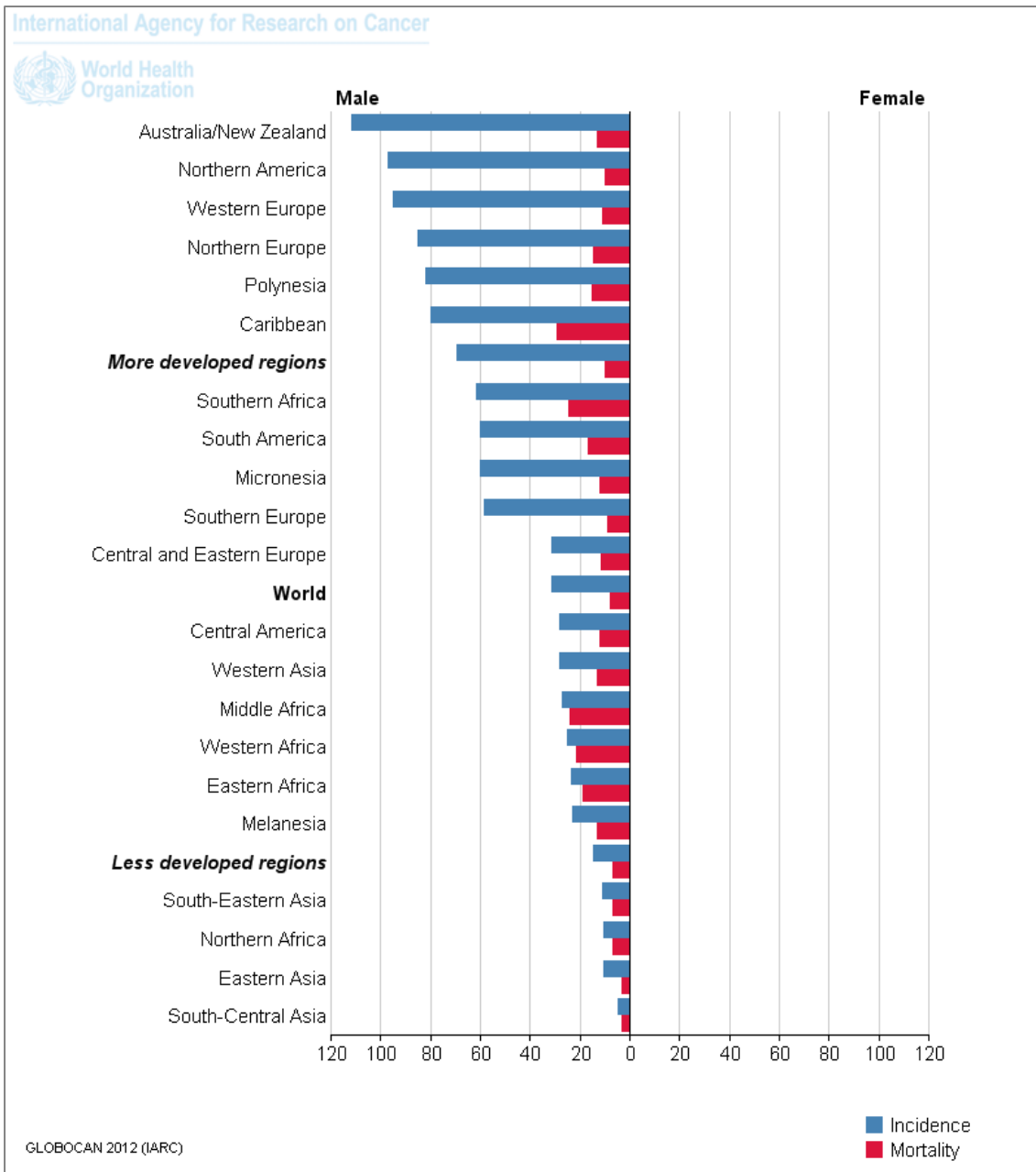


Figura 1-1 Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC. Incidencia y Mortalidad por países.

Las tasas de incidencia son también relativamente altas en algunas regiones menos desarrolladas tales como el Caribe (79.8), Sudáfrica (61.8), y Sur América (60.1), pero permanecen más bajas en las regiones asiáticas con tasas estimadas de 10.5 y 4.5 en el Este y Sur-Centro de Asia (Figura 1-2) Este dato se debe al uso extendido del PSA como screening y a la realización de biopsias transrectales.<sup>3,4</sup>

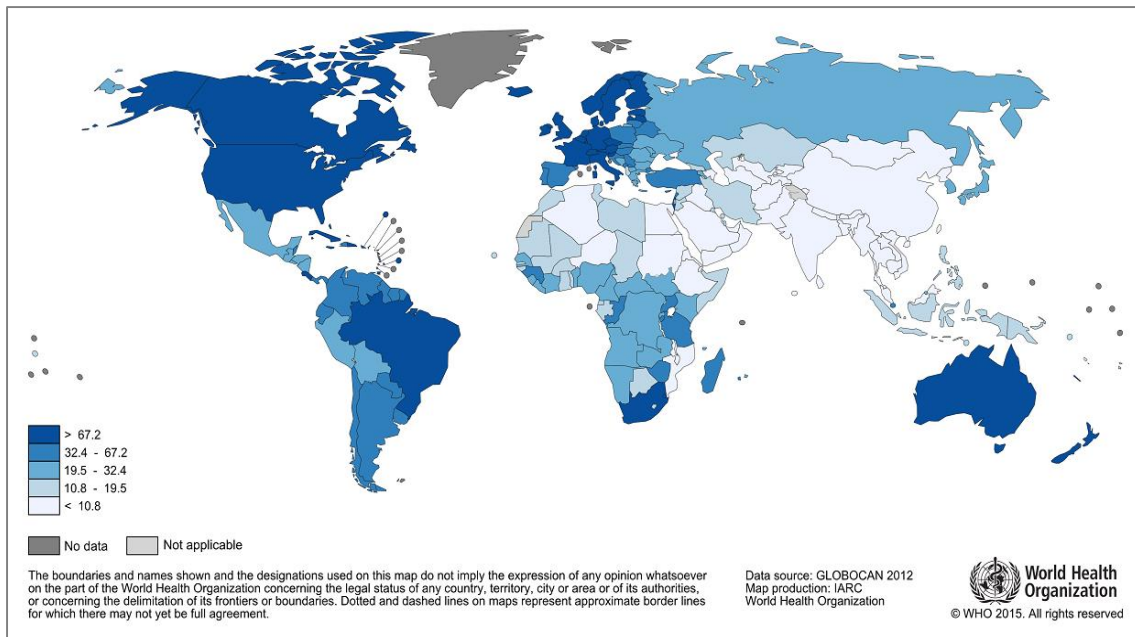


Figura 1-2 Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC. Distribucion de las tasas mundiales de Incidencia.

El cáncer de próstata es la quinta causa de muerte por cáncer en varones, con una estimación de 307.000 muertes en 2012, correspondiendo a un 6,6% del total de muertes en hombres.

No hay mucha variación en las tasas de mortalidad mundiales con respecto a las observadas para incidencia, con un número mayor de muertes por cáncer de próstata en los países menos desarrollados que en las regiones más desarrolladas (165.000 y 142.000 respectivamente)<sup>2, 3</sup>

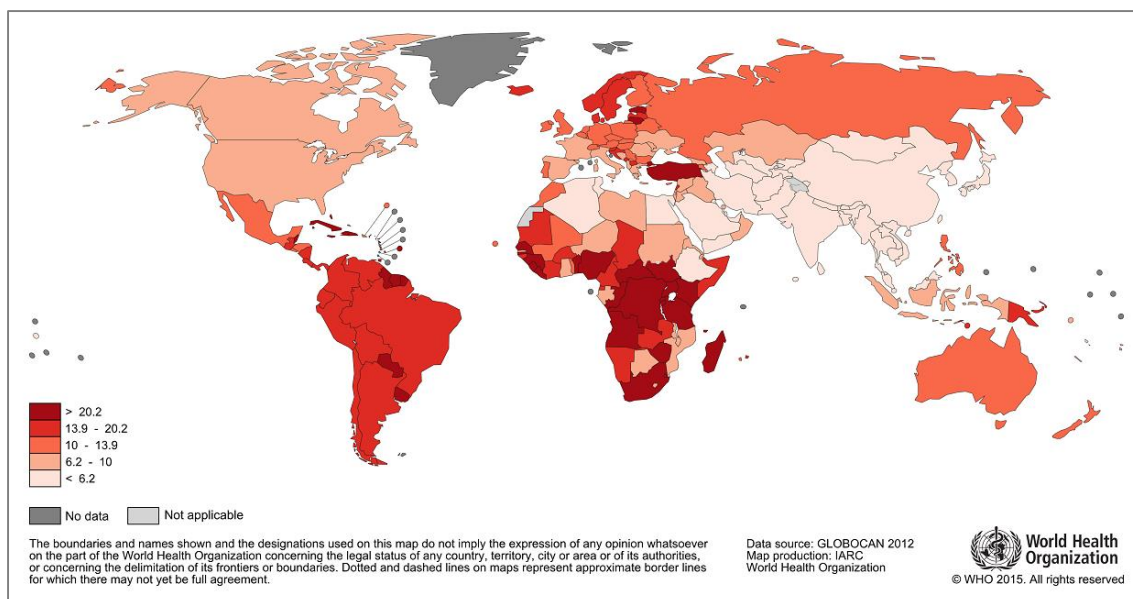


Figura 1-3 Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC. Distribucion mundial de las tasas de mortalidad.

Las tasas de mortalidad son generalmente altas en poblaciones afroamericanas y africanas (Caribe 29 por cada 100.000, África Subsahariana 19-24 por cada 100.000), muy bajas en Asia (2.9 por 100.000), e intermedias en Oceanía y América (Figura 1-3)

La incidencia de éste tipo de neoplasia, es superior en la población afro-americana, siendo la incidencia del carcinoma prostático en hombres caucásicos mayores de 65 años de 1.180 nuevos casos de cada 100.000 habitantes, mientras que en la población afroamericana con la misma edad es de 1698 nuevos casos de cada 100.000 habitantes.

Más del 75% de los tumores se diagnostican en personas mayores de 65 años. En menores de 65 años, la incidencia de carcinoma prostático para los blancos americanos es de 45 de cada 100.000 habitantes, y en los afro-americanos es de 81 nuevos casos de cada 100.000.<sup>5</sup>

En Europa el cáncer de próstata es el tumor solido más común con una tasa estandarizada por edad de 60,9 casos por cada 100.000 habitantes por año. Así, alrededor del 22% de los cánceres que afectan al hombre son cáncer de próstata en los países desarrollados en comparación con el 4% en los países en desarrollo. Hay

grandes diferencias regionales en las tasas de incidencia del cáncer de próstata con un rango de 68.8 en Malta a 182 en Bélgica<sup>6, 7, 8</sup>.

En España el cáncer de próstata es el tumor solido más frecuente en hombres, seguido del cáncer de pulmón y colorrectal (Tabla 1-1)

Tabla 1-1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit T, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Incidencia y Mortalidad de cancer mundial: IARC.

	Hombre	Mujer	Ambos sexos
1º	Próstata	Mama	Colorrectal
2º	Pulmón	Colorrectal	Próstata
3º	Colorrectal	Cuerpo de útero	Pulmón
4º	Vejiga	Pulmón	Mama
5º	Estómago	Ovario	Vejiga

La incidencia de cáncer global en España en hombres en 2012 se encuentra entre las más altas respecto del resto del mundo (similar al resto de los países desarrollados, superior a la tasa mundial) La tendencia de la incidencia del cáncer en España ha sido aumentar lentamente (Figura 1-4) El incremento de la incidencia podría explicarse por el crecimiento de la población y su envejecimiento.<sup>5</sup>

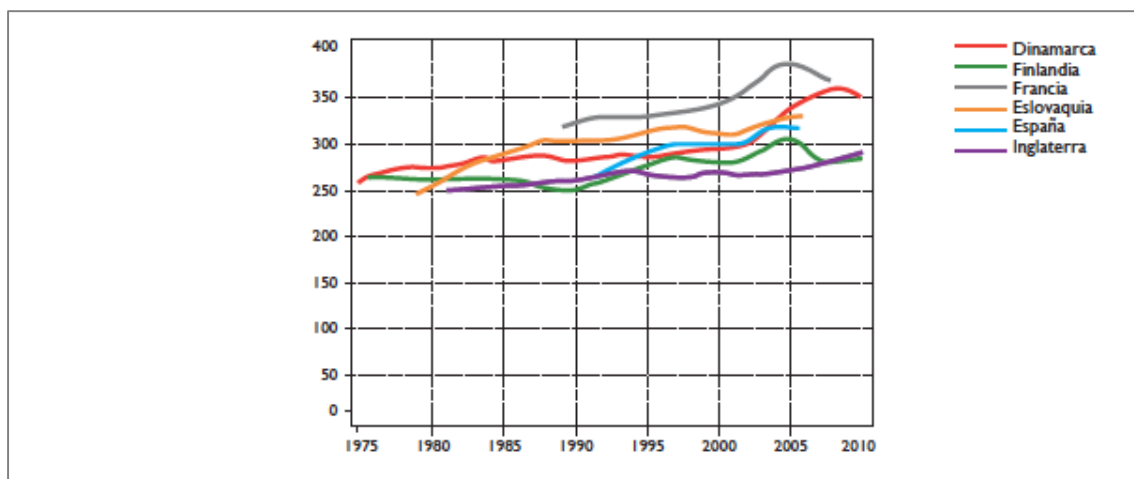


Figura 1-4. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit T, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, IARC. NORDCAN ([www.ancre.nu](http://www.ancre.nu)) ECO ([eco.iarc.fr](http://eco.iarc.fr)) England: [www.ons.gov.uk](http://www.ons.gov.uk). Incidencia y Mortalidad mundial.

Conocer la incidencia es determinante para dimensionar el impacto de la enfermedad y establecer prioridades de actuación. Por ello desde la Asociación Española de Urología se llevó a cabo un registro nacional de cáncer de próstata para conocer tanto la incidencia como el perfil clínico de los pacientes. Este registro concluyó que la tasa de incidencia estimada estandarizada a población española es de 82,27 por 100.000 varones con una estimación de la tasa de incidencia en la Comunidad de Madrid de 92,29.<sup>9</sup>

La tendencia de la mortalidad por cáncer global en España ha sido disminuir a partir de los años 90, encontrándose en tasas similares a las de los países más desarrollados y a la tasa de todos los países del mundo (Figura 1-5) La disminución en mortalidad puede explicarse por los avances en diagnóstico precoz y en terapias más eficaces.

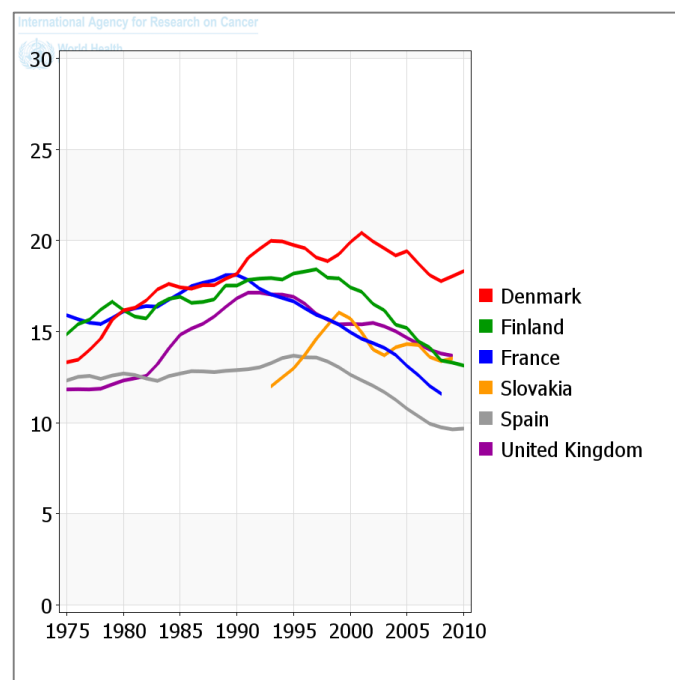


Figura 1-5. WHO ([www.who.int/healthinfo/en/](http://www.who.int/healthinfo/en/)). Mortalidad por cáncer de próstata.

Las tasas de detección del cáncer de próstata han variado a lo largo del tiempo. Teniendo como país de referencia a Estados Unidos, la incidencia del cáncer de próstata, del periodo comprendido entre 1973-1986 aumentó en un 178% (Figura 1-6) El aumento se acentuó especialmente entre 1986-1991, cuando se impuso la biopsia transrectal ecodirigida a la resección transuretral y se multiplicó por 10 el uso

diagnóstico del PSA para justificar la biopsia de próstata y diagnosticar un mayor número de casos de cáncer de próstata.<sup>10</sup>

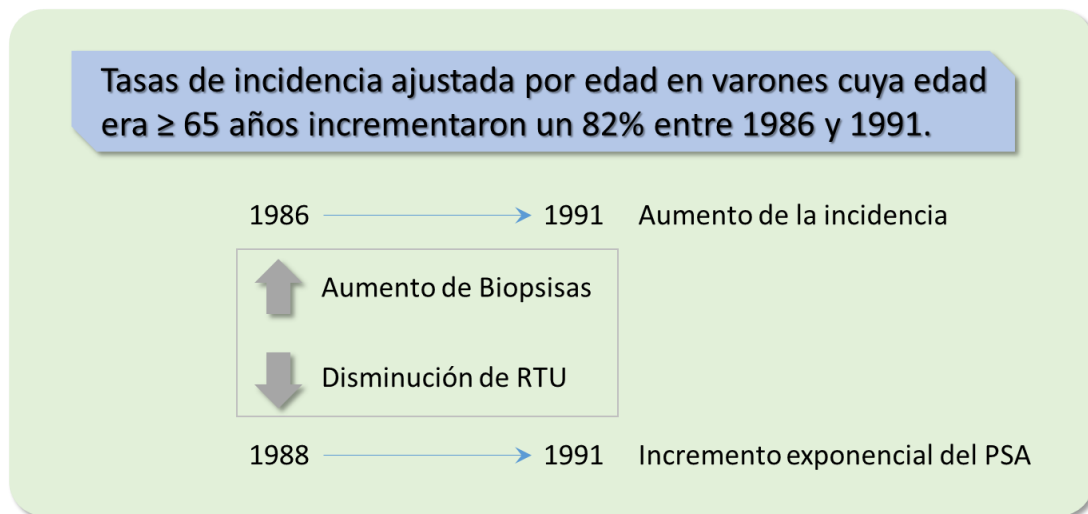


Figura 1-6. 10. Potosky AL, Miller BA, Albertsen PC, Kramer BS. The role of increasing detection in the rising incidence of prostate cancer. JAMA. 1995, 273(7): 548-552. Esquema de aumento en el número de biopsias.

## 1.2 FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Aunque las causas específicas del inicio y la progresión del cáncer de próstata todavía no se conocen completamente, hay numerosos datos que señalan al papel de la genética y el medio ambiente como elementos imprescindibles en el origen y la evolución de la enfermedad.

### 1.2.1 INFLUENCIAS GENÉTICAS Y FAMILIARES

El riesgo relativo de padecer cáncer de próstata aumenta según el número de miembros de la familia con la enfermedad, su grado de parentesco y la edad a la cual se diagnosticó el tumor.<sup>11</sup> Si un familiar de primer grado (padre, hermanos) tiene cáncer de próstata, el riesgo se duplica por dos. Si dos o más familiares de primer grado están afectados el riesgo se incrementa por 5-11 veces<sup>12</sup>. Según datos del registro nacional de cáncer de próstata el 5,7% de los pacientes incluidos en el estudio con cáncer de próstata tenían antecedentes familiares y en el 93% de estos casos eran padres y/o hermanos.<sup>9</sup>

El cáncer de próstata se presenta con tres fenotipos: esporádico, familiar y hereditario. La forma esporádica es la que aparece en individuos sin antecedentes familiares representando alrededor del 85% de todos los cánceres de próstata. Aproximadamente 15% son familiares o hereditarios. El cáncer de próstata hereditario se asocia a una edad de presentación menor (55 años o menor), y constituye el 43% de la enfermedad y tan solo el 9% de los cánceres que se producen a los 85 años <sup>13</sup>.

El cáncer de próstata familiar se define como la enfermedad en un paciente que tiene uno o más familiares afectados. El hereditario es un subgrupo del familiar y ha sido definido operativamente como núcleos familiares con tres o más miembros afectados, cáncer de próstata en tres generaciones sucesivas, o dos individuos afectados con diagnóstico de cáncer antes de la edad de 55 años <sup>14</sup>.

La existencia de un cáncer de próstata hereditario verdadero es sugerido por tres observaciones epidemiológicas:

1. Los familiares de pacientes menores de 55 años tienen mayor riesgo de cáncer de próstata que aquellos con familiares afectados de mayor edad
2. Existe un agrupamiento familiar más fuerte en las familias con cáncer de próstata de inicio temprano
3. El número de miembros afectados de la familia y su edad al inicio son los determinantes más importantes del riesgo entre los familiares.

### **1.2.2 EDAD**

Es el factor de riesgo más importante para desarrollar cáncer de próstata.<sup>15</sup> La probabilidad de presentar un cáncer de próstata es de 1 entre 10.000 desde el nacimiento hasta los 39 años; de 1 entre 103 de los 40 a los 59 y de 1 entre 8 de los 60 a 79 años. Entre los 30 y los 40 años, según datos de las necropsias, los hombres tienen pequeños focos neoplásicos que pueden evolucionar con el tiempo en las

personas mayores hacia lesiones más extensas con características de progresión tumoral.

Se estima que un 33.3% de los hombres en la octava década de la vida <sup>16</sup> y hasta un 70% según diferentes autores tienen cambios histológicos compatibles con cáncer de próstata <sup>17</sup>.

A pesar de lo anterior, se considera que un 10% de los tumores prostáticos no progresan clínicamente, resultando poco probable que produzca manifestaciones clínicas a lo largo de la vida del paciente. Estos hallazgos indican que existen factores exógenos que afectan al riesgo de progresión del cáncer latente al cáncer de próstata con manifestaciones clínicas. <sup>18, 19, 20</sup>

### **1.2.3 GEOGRAFÍA Y ETNIA**

En la raza negra (afroamericanos) el cáncer de próstata aparece más precozmente debido fundamentalmente a los altos niveles de testosterona sérica. Por el contrario en los pacientes asiáticos el riesgo es inferior pudiendo deberse a una actividad reducida de 5 $\alpha$ -reductasa <sup>21, 22</sup>.

Las diferencias en supervivencia se han cuantificado en 66% a los cinco años en pacientes afroamericanos y un 81% en norteamericanos de origen europeo. Estas diferencias eran especialmente acusadas en pacientes con menos de 70 años. En pacientes afroamericanos el pronóstico en supervivencia libre de recidiva después de prostatectomía radical para estadios localizados es inferior a otros grupos étnicos <sup>23</sup>.

### **1.2.4 DIETA**

Se ha sugerido que la ingesta de grasas saturadas se relaciona con un aumento de riesgo en la incidencia de cáncer de próstata de 2 a 3 veces, independientemente de la masa corporal, actividad física o la ingesta de micro nutrientes, lo que se atribuye al incremento de ácido alfa-linoleico como responsable de generar estrés oxidativo y daño en el DNA. <sup>24</sup>

Múltiples estudios se están desarrollando en torno a esclarecer la relación de los factores de riesgo con el cáncer de próstata ya que la mayoría hasta ahora son estudios casos controles. Algunos investigadores postulan que existe una asociación entre un aumento de la resistencia insulínica y la hiperinsulinemia, responsable de la producción del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) en el hígado. Éste es un potente factor mitogénico e inhibidor de la apoptosis que se ha relacionado con el cáncer de próstata.<sup>25</sup>

Se han descrito diferentes nutrientes con un posible efecto protector como por ejemplo los ácidos grasos esenciales (omega-3); licopenos (tomates y sus derivados con alto poder antioxidante); zanahoria y carotenoides; selenio; vitaminas E, D, A y retinoides. Los productos derivados de la vitamina A ejercen una acción in vitro suprimiendo la acción de la 5 $\alpha$ - reductasa y por tanto de la dihidrotestosterona.

Los fitoestrógenos (arroz, soja, cereales, Té verde) presentan actividad estrogénica, inhiben la enzima 5 $\alpha$ - reductasa y la aromatasa, inhiben la proteinkinasa tiroxina-específicas y las topoisomerasas del ADN <sup>26</sup> pudiendo tener un efecto protector sobre el cáncer de próstata

### **1.2.5 VITAMINA D**

El interés de la vitamina D como determinante del riesgo de cáncer de próstata proviene de varias observaciones epidemiológicas <sup>27</sup>:

1. Los valores de ésta en varones con cáncer de próstata son menores que en los varones que no presentan la enfermedad y su concentración está determinada por su ingesta dietética y por su conversión asociada a la luz solar
2. Los hombres que viven en regiones con menos exposición ultravioleta tienen una tasa mayor de mortalidad por cáncer de próstata.
3. El cáncer de próstata se presenta más a menudo en hombres con edad avanzada, en los cuales la deficiencia de vitamina D es más frecuente por la

menor exposición solar y la disminución relacionada con la edad de las hidroxilasas responsables de la síntesis de la vitamina D activa.

4. Los afroamericanos cuya melanina cutánea bloquea la radiación ultravioleta e inhibe la activación de la vitamina D, tienen las tasas mundiales más altas de incidencia y mortalidad por cáncer de próstata.
5. La ingesta de productos lácteos ricos en calcio, que disminuyen las concentraciones de vitamina D, se asocian con un riesgo mayor de cáncer de próstata.
6. Los japoneses nativos, cuya dieta es rica en vitamina D derivada del pescado, tienen baja incidencia de cáncer de próstata.

Se ha visto que las células del cáncer de próstata expresan el receptor de la vitamina D, y varios estudios demostraron un efecto antiproliferativo de la vitamina D sobre las líneas celulares del cáncer de próstata por la inducción de la detención del ciclo celular <sup>28</sup>.

El *Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort* analizó una cohorte prospectiva de 65321 hombres y reveló un riesgo relativo de CP ligeramente aumentado (1,3) en las personas con ingesta elevada de calcio en la dieta de forma aislada (>2.000 frente a <700 mg/día), pero no en aquellas con un alto consumo de lácteos <sup>29</sup>, explicado por las variantes en el receptor de la vitamina D <sup>30</sup>

### **1.3 QUIMIOPREVENCIÓN**

Se reconoce la existencia de lesiones precursoras de cáncer de próstata (ASAP y PINAG) que representan estadios intermedios entre células normales y malignas hasta 20 años antes de la aparición del cáncer. Por otro lado, está bien establecida la relación entre la edad y la incidencia del cáncer de próstata. Estas evidencias sugieren que la carcinogénesis se produce lentamente durante un intervalo prolongado, lo que permitiría una intervención preventiva antes de que se desarrolle la neoplasia maligna, mediante cambios en el estilo de vida (dieta, ejercicio...), o con

quimioprevención: uso de sustancias sintéticas o naturales que inhiben o previenen el desarrollo de cáncer.

Por estos motivos se han llevado a cabo ensayos relevantes en prevención de cáncer de próstata.

El Ensayo de Prevención del cáncer de próstata (*Prostate Cancer Prevention Trial, PCPT*)<sup>31</sup> fue el primer ensayo poblacional a gran escala. Se basó en dos observaciones:

1. Los andrógenos son necesarios para el desarrollo de cáncer de próstata, y
2. Los hombres con deficiencia congénita de 5alfa-reductasa tipo 2 no son afectados por la hiperplasia prostática benigna ni el cáncer de próstata.

El PCPT evaluó la hipótesis de que el tratamiento con finasteride, que induce una deficiencia adquirida de 5-alfa reductasa tipo 2, disminuiría las concentraciones intraprostáticas de dihidrotestosterona y prevendría así el cáncer de próstata.

En este ensayo se demostró una reducción de la incidencia de cáncer de próstata del 24,8% respecto a placebo en un plazo de 7 años. Los cánceres que se detectaron en el grupo tratado con finasteride mostraron cierta tendencia a ser más agresivos que los que sucedieron en los pacientes con placebo. Esto se debe posiblemente a que las glándulas prostáticas tratadas con finasteride eran de media un 25% más pequeñas que las del grupo tratado con placebo. Se evaluó histológicamente una proporción mayor de la glándula prostática lo que conlleva a una posibilidad más elevada de detectar cáncer (sesgo por sobredetección)<sup>32</sup>.

El ensayo REDUCE (*Reduction by Dutasteride of Prostate Cancer Events*), evaluó el efecto de dutasteride para reducir el riesgo de desarrollar cáncer de próstata, demostrando una reducción del 23 %. Al igual que en el PCPT, se encontró un pequeño aumento, no significativo estadísticamente, de las formas de cáncer con índice Gleason entre 8 y 10 (tumores mal diferenciados) El número de tumores con puntuación de Gleason de 7 a 10 no difirió significativamente entre el grupo de

dutasteride y el grupo placebo (220 y 233, respectivamente,  $p= 0,81$ ) Había 29 tumores con Gleason de 8 a 10 en el grupo de dutasteride y 19 en el grupo placebo ( $p= 0,15$ ) Aunque el número de tumores con Gleason de 8 a 10 fueron similares en los dos grupos durante los años 1 y 2 (17 y 18 en los grupos placebo y dutasteride, respectivamente), durante los años 3 y 4, hubo 12 tumores con Gleason de 8 a 10 en el grupo de dutasteride, en comparación con sólo 1 en el grupo placebo ( $p= 0,003$ ) Los autores especulan que si los hombres en el grupo placebo que tenía los 141 tumores con una puntuación de Gleason de 5-7 detectados durante los años 1 y 2 hubieran permanecido en el estudio, una proporción de los cánceres podrían haberse convertido en la biopsia durante el año 3 y 4 en tumores de mayor grado, estrechando así la diferencia entre los dos grupos en el número de tumores con Gleason de 8 a 10 en el año 3 y 4 <sup>33</sup>.

## **1.4 PAPEL E INFLUENCIA DE LOS ANDRÓGENOS**

### **1.4.1 ANDRÓGENOS Y 5 ALFA REDUCTASA**

Durante la embriogénesis, los andrógenos son imprescindibles para la masculinización de los genitales externos, y el desarrollo de la próstata. Fisiológicamente y en el cáncer de próstata andrógeno dependiente, la testosterona y su metabolito la DHT son los dos principales factores de crecimiento de las células de la próstata.

La testosterona es sobre todo necesaria para el mantenimiento de la masa muscular, la densidad ósea, la salud cardiovascular, el recuento de hematíes, la espermiogénesis y la libido <sup>34</sup>. Por otro lado la DHT regula principalmente las acciones que median los andrógenos intraprostáticos.

De todos los andrógenos circulantes, el 10% son secretados por la corteza suprarrenal (Figura 1-7) En el varón la testosterona es el andrógeno circulante más importante, 95% de la cual es producida por las células de Leydig testiculares bajo el estímulo de la gonadotropina hipofisaria (LH) Sin embargo, se comporta como una prohormona,

ya que la forma activa en la próstata es su metabolito reducido por la enzima 5 $\alpha$ -reductasa, la dihidrotestosterona, metabolismo que tiene lugar directamente en la glándula prostática donde constituye la forma con mayor concentración <sup>35</sup>.

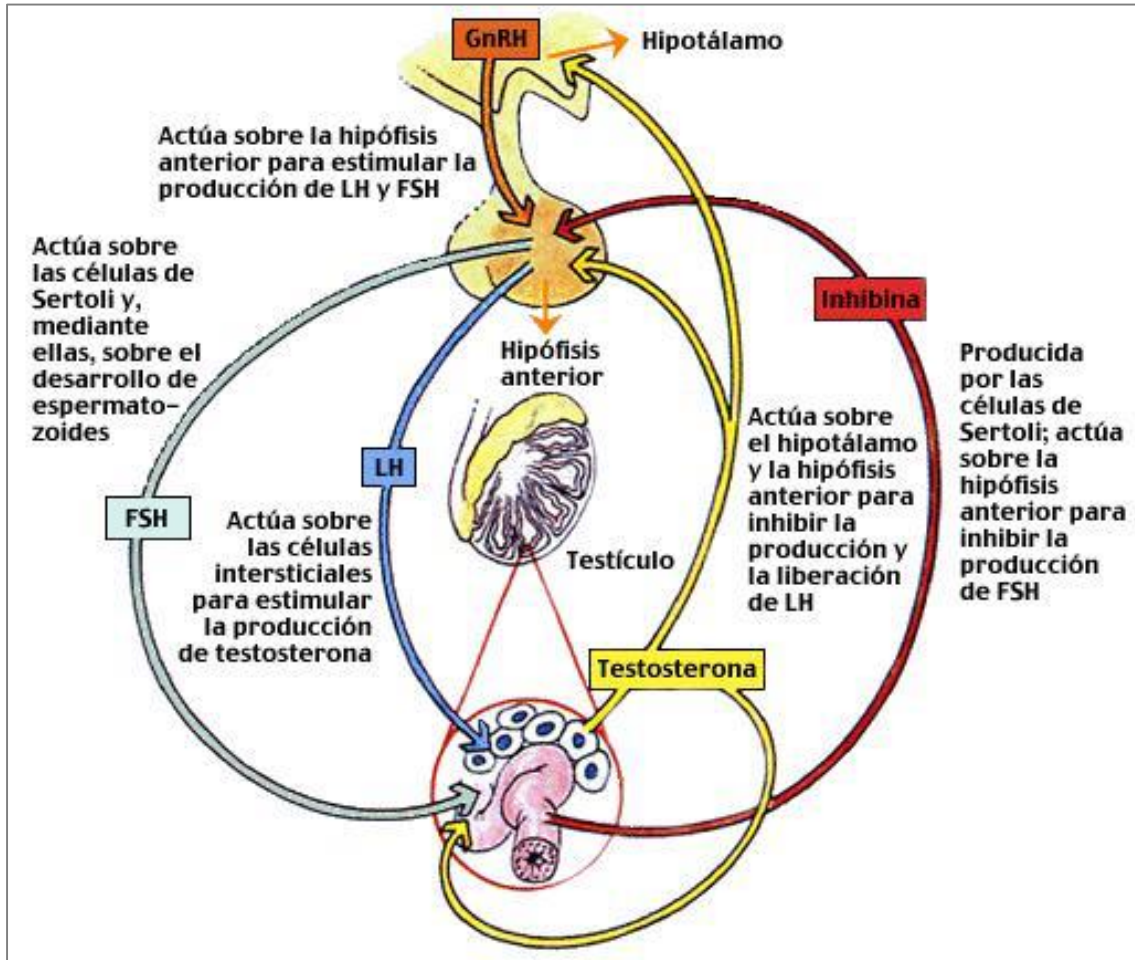


Figura 1-7. [http://www.slideshare.net/roci0f\\_2011/androgenos-presentation](http://www.slideshare.net/roci0f_2011/androgenos-presentation). Eje hipotálamo-hipofisario-testicular.

La DHT actúa uniéndose al receptor androgénico (AR) intracitoplasmático con mucha mayor afinidad que la testosterona, y la unión de DHT a la AR aumenta la translocación del complejo de esteroide-receptor en el núcleo y la activación de elementos de respuesta a andrógenos <sup>36</sup> (Figura 1-8) Hay dos isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa, productos de dos genes separados. La tipo 1 5 $\alpha$ -reductasa se expresa principalmente en la piel y el hígado y, en menor medida, en la próstata, mientras que la enzima tipo 2 se expresa predominantemente en el epitelio de la próstata y otros tejidos genitales<sup>37</sup>.

La funcionalidad de la isoenzima tipo 2 5 $\alpha$ -reductasa es un requisito imprescindible para el desarrollo normal de la próstata y los genitales externos en el embrión.

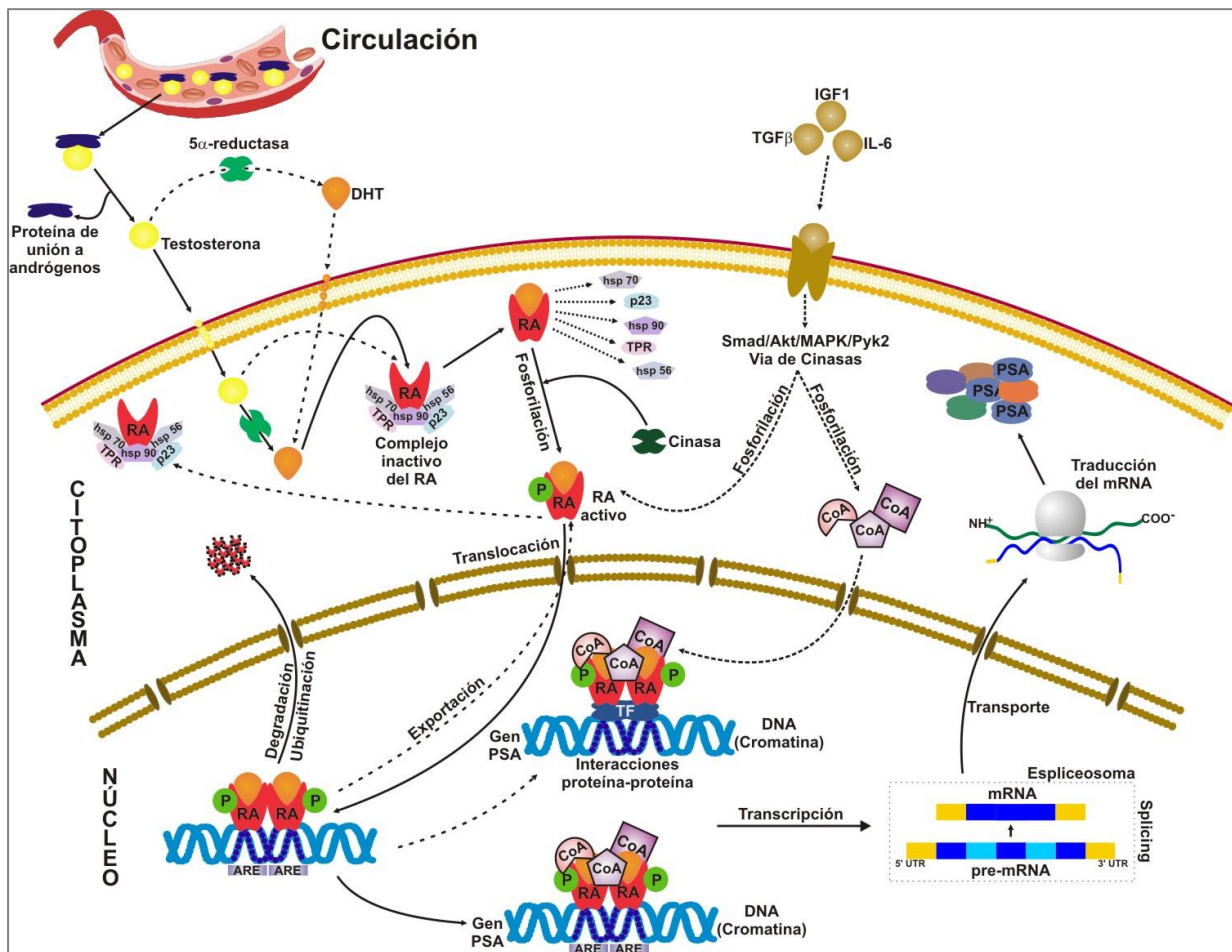


Figura 1-8. Mecanismo de acción del RA en una célula prostática. El efecto de los andrógenos empieza con el transporte de la testosterona al lugar de acción a través de la circulación. La testosterona es metabolizada a DHT, en el estroma, por la enzima 5 $\alpha$ -reductasa y se transporta por difusión pasiva al citoplasma. Adaptado de Luke y Coffey, 1994; Heinlein y Chang, 2004; Weigel y Moore, 2007

Por otro lado la exposición insuficiente de la próstata a DHT parece proteger contra el desarrollo de cáncer de próstata.

La ausencia de testosterona circulante también puede proteger contra el desarrollo de cáncer de próstata, como se evidencia en las próstatas atróficas visto en los hombres después de la castración quirúrgica<sup>38</sup>. Aunque la exposición de la próstata a los andrógenos parece ser requisito para el desarrollo posterior de cáncer de próstata, la duración y la magnitud de la exposición a andrógenos necesaria para establecer el escenario de la carcinogénesis se desconoce.

Wu et al, hallaron que las concentraciones de testosterona total y biodisponible son máximas en los estadounidenses, intermedias en los afroamericanos, y mínimas en los de raza blanca <sup>39</sup>.

#### **1.4.2 RECEPTOR ANDROGÉNICO**

La testosterona y la DHT difunden por las células y se unen al RA-h en el citoplasma, iniciando una cascada de eventos que desencadena en expresión génica, que podría abarcar cambios conformacionales en la cromatina y acetilación de las histonas, proteínas que forman parte del núcleo celular <sup>40</sup>. En la próstata el RA-h está en las células epiteliales secretoras y estromales, y está ausente en las células basales no proliferativas<sup>41, 42</sup>. En el grupo de células que se denominan de “tránsito de amplificación”, la señalización del RA-h induce la proliferación y diferenciación de las células secretoras luminales. En estas se induce la expresión de factores prostáticos específicos como el PSA.

En los primeros estadios de desarrollo, los andrógenos se unen a receptores de andrógenos (RA) localizados en células mesenquimáticas ya que la diferenciación de la próstata y su posterior crecimiento depende inicialmente del estroma prostático. Posteriormente las células epiteliales adquieren el RA y presentan un crecimiento autónomo con respecto a las células estromales.

La regulación endocrina de la próstata es la consecuencia de la acción de un mediador exógeno, la testosterona, que desencadena la expresión de factores de crecimiento y de supervivencia llamados colectivamente “andromedinas”, que difunden a través de la membrana basal, se unen a receptores extracelulares en las células basales y luminales, y estimulan su proliferación y supervivencia.<sup>43</sup> Se encuentran, a su vez, modulados en forma autocrina o paracrina por otros factores inhibidores del crecimiento o inductores de la apoptosis (Figura 1-9)

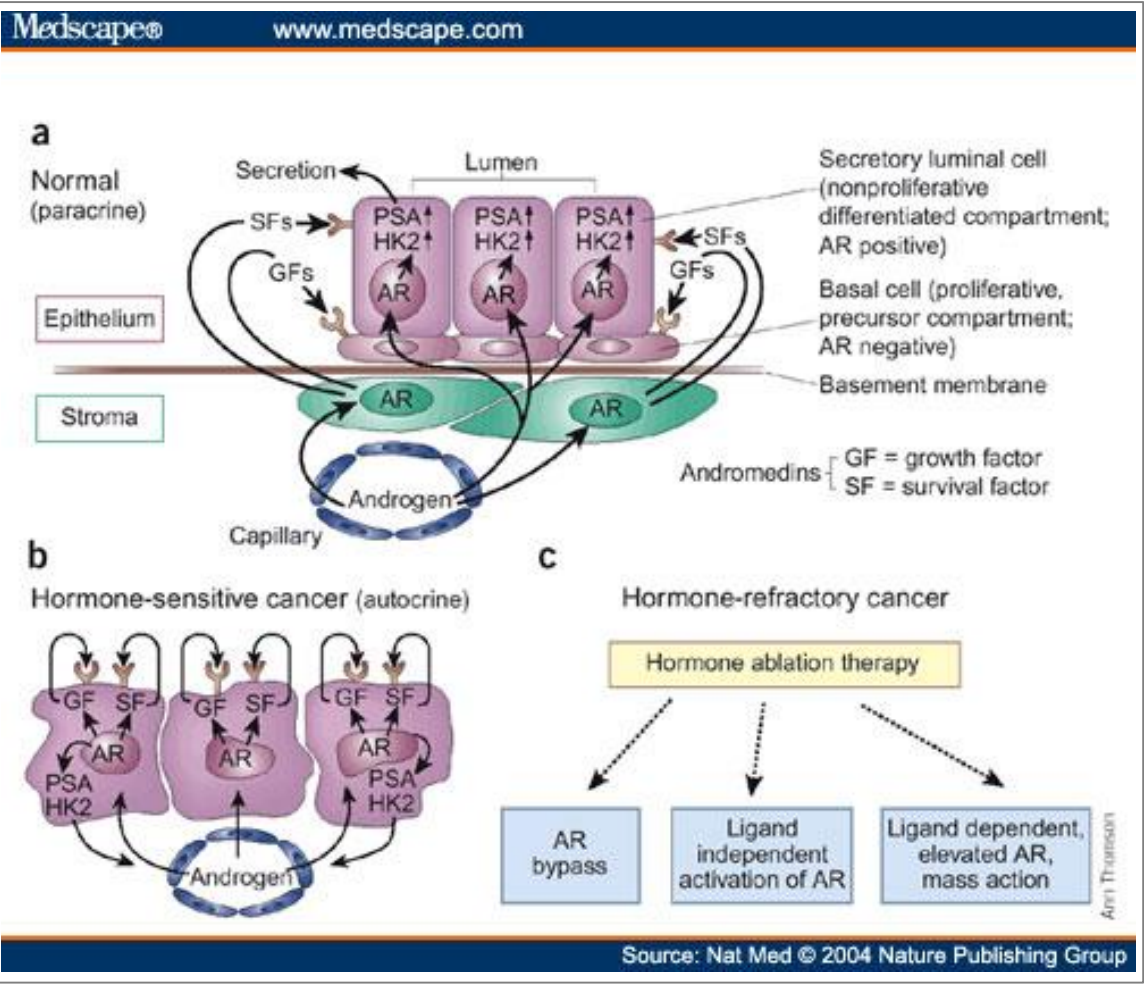


Figura 1-9. [www.medscape.com](http://www.medscape.com). Regulación paracrina, autocrina y refractaria a andrógenos de las células prostáticas.

El efecto sobre el ciclo celular ocurre a través de proteínas reguladoras como quinasas (CDK1, CDK2, CDK4), ciclinas (D3 y A) y otras con acción inhibitoria (p21, p27 y p16) Además, aumenta la expresión de factores estimulantes del crecimiento vascular, asegurando la nutrición adecuada de la próstata en desarrollo (VEGF o factor de crecimiento del endotelio vascular) Al mismo tiempo, dentro de este complejo entramado de factores estimulantes e inhibidores el complejo andrógeno-RA activa genes que limitan el crecimiento prostático como bcl-2, que tiene una correlación inversa con la expresión del RA en el tejido prostático y cuya inactivación induce apoptosis celular <sup>40</sup>.

En el cáncer de próstata la señalización paracrina se encuentra alterada; las células son capaces de producir sus propias andromedinas y pueden estimular su propio crecimiento a través de mecanismos autocrinos.

En ausencia de andrógenos la disminución de la producción de andromedinas por las células del estroma conlleva la disminución de la proliferación y apoptosis de las células epiteliales y estromales <sup>44</sup>. A pesar de eso, factores de crecimiento andrógeno-independientes de las vías de señalización del RA-h, como el factor de crecimiento hematopoyético (HGF) y su receptor (HGF-R), sustentan a la población de las células basales a pesar de los niveles de castración.

### **1. RELEVANCIA DE LA CAPACIDAD FUNCIONAL DEL RECEPTOR ANDROGÉNICO:**

El gen del RA se localiza en el cromosoma Xq11-q13, representa 180 Kb de ADN y configura al menos 8 exones conocidos.

Funcionalmente se compone de 4 dominios: el NH<sub>2</sub>-terminal (NTD), codificado por el exón 1 responsable de la activación de la transcripción; el de unión al ADN (DBD), codificado por los exones 2 y 3: una región bisagra que contiene una señal de localización nuclear; y un COOH-terminal (LBD), codificado por los exones 4-8 que contiene el sitio de unión a esteroides, factores de transcripción y proteínas de choque térmico. Las mutaciones en los distintos dominios condicionan alteraciones de la función que pueden contribuir al desarrollo del estado de andrógeno independencia <sup>45</sup>.

### **2. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR POR EL RA-h**

A nivel celular la respuesta clínica tras el Bloqueo Androgénico se debe a la inducción de la muerte celular o la detención del ciclo celular <sup>46</sup>. El RA-h es capaz de regular la progresión del ciclo celular de G1-S (Figura 1-10)

Las transiciones de entrada y en el ciclo celular mitótico son dictadas por la coordinación de la activación de las quinasas dependientes de ciclinas. Una vez que

están activos los complejos CDK-ciclina (acumulación de ciclinas de tipo D, ciclinas D1, D2 y D3), la principal función de los complejos CDK4/6-ciclina D, es iniciar la fosforilación de la proteína supresora de tumor retinoblastoma (RB) y, por consiguiente, eliminar su función represora.

La transición durante el resto del ciclo celular (fases G2 y M) es impulsada por la activación ordenada de CDK1-ciclina A y CDK1-ciclina B. La ciclina B aumenta de manera constante en la fase G2 y cuando alcanza el umbral comienza la fase M.

Con respecto a todo esto se ha comprobado que las células del cáncer de próstata andrógeno dependiente precisan de los andrógenos como reguladores esenciales de la transición G1-S del ciclo celular. En la proliferación regulada por andrógenos existe un equilibrio entre la CDK2, CDK4 y p16 (inhibidor CDK4) que se pierde en la proliferación celular del cáncer de próstata por mutación o amplificación del RA-h<sup>47</sup>, figura5. La supresión androgénica en el cáncer de próstata detiene el ciclo celular en la fase G1 temprana, y se traduce en una pérdida de expresión de ciclina D1 y ciclina D3, la disminución de la actividad CDK4, y el estado de hipofosforilación/RB/activado <sup>48, 49</sup>.

Algunos estudios observan que la inducción de la expresión de la ciclina D-1 por los andrógenos se realiza a través del receptor mTOR <sup>48</sup>. Esta capacidad de los andrógenos para modular la trasducción ciclina D/mTOR dependiente le confiere especificidad con respecto a los mecanismos utilizados en la fase G1.

Los niveles de ciclina A y la actividad CDK2 se reducen en la ablación androgénica. Además se aumentan los niveles de p27Cip1 (inhibidor de kinasas), que pueden contribuir a la disminución de la actividad CDK2(39), y este en consonancia con algunos estudios que demuestran que niveles bajos de la expresión del gen p27Cip1 son un factor predictivo de recurrencia precoz del cáncer de próstata <sup>50</sup>.

La expresión del gen p21Cip1 se pierde tras la supresión androgénica. Otros estudios muestran que un incremento de a expresión del gen p21Cip1 se relaciona con un mayor índice de proliferación y grado de Gleason <sup>51</sup>.

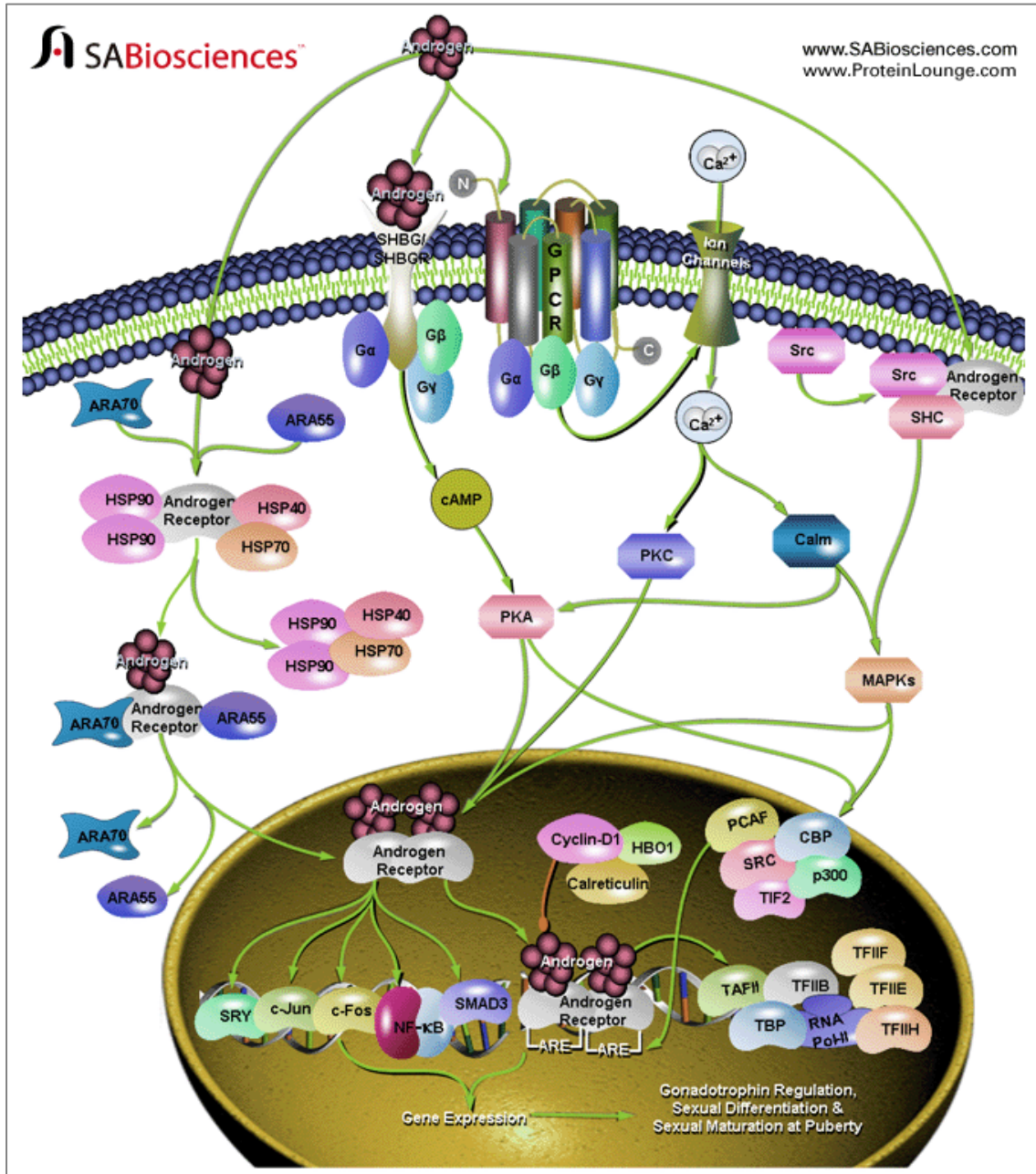


Figura 1-10. Tomada de [www.sabiosciences.com](http://www.sabiosciences.com). Regulación del ciclo celular a través del complejo andrógeno-receptor.

### 3. PAPEL DEL RA-H EN LA CARCINOGENESIS

El RA está compuesto por cuatro dominios diferentes. De estos el dominio amino terminal tiene una cola de tripletes de nucleótidos que codifican el aminoácido

glutamina y que varía su longitud entre individuos. Una menor longitud se asocia con una mayor actividad del RA y además se correlaciona con un mayor riesgo de presentar cáncer de próstata, con una mayor agresividad de los tumores <sup>52, 53</sup> y su aparición en edades precoces <sup>54</sup>. La correlación entre fragmentos poli-CAG más cortos y el desarrollo de cáncer de próstata podría explicar la mayor incidencia de esta neoplasia en la comunidad negra americana, que presentan fragmentos generalmente más cortos de CAG que otras razas <sup>55</sup>. Además de la variabilidad descrita en la cola de nucleótidos del gen RA, se describieron también mutaciones, más frecuentes en estadios avanzados, que se identifican hasta en el 50% de los pacientes <sup>56, 57, 58</sup>. La mayoría de estas mutaciones consisten en la sustitución de aminoácidos, que pueden ser “silentes”, aparentemente sin afectar la función del RA in vitro, alterar la especificidad del RA por el ligando o inactivar el RA. El primer grupo de mutaciones no parecen conferir ninguna ventaja a las células tumorales, mientras que el segundo y tercer grupo podrían ser cambios inherentes al crecimiento en situación de baja impregnación androgénica o independencia de andrógenos. El RA está sobreexpresado en el 28-30% de los tumores de pacientes en tratamiento con antiandrógenos <sup>59,60</sup>. Pequeños cambios, como sustituciones de aminoácidos en el centro activo o de ligadura del receptor, modifican la afinidad y especificidad del receptor. Como consecuencia, el tumor puede crecer en la presencia de antiandrógenos, andrógenos adrenales y otros esteroides como estrógenos y progesterona <sup>61,62</sup>. Finalmente, a medida que el tumor progresa no precisa de andrógenos ni del RA por mecanismos aún no comprendidos. Visakorpi et al. comunicaron la existencia de un gen de amplificación AR en los tumores hormonorrefractarios, lo que sugiere, que el aumento del número de copias de RA, influiría en la progresión de los tumores andrógeno-independientes <sup>60</sup>. Se han informado también mutaciones en RA en tumores andrógeno independientes que vuelven al RA susceptible a ligandos no androgénicos y pueden contribuir a la progresión del cáncer de próstata <sup>63</sup>.

### 1.4.3 CARCINOGENESIS

El desarrollo de cáncer de próstata es un proceso complejo consecuencia de acumulación progresiva de eventos genéticos. El genoma de cada hombre es el punto de partida. Está basado en un conjunto de polimorfismos de líneas germinales y por tanto el riesgo de padecer cáncer a lo largo de la vida puede variar <sup>64</sup>. El efecto acumulativo de los polimorfismos puede conllevar uno o más eventos genéticos y proporcionar un ambiente donde se puedan dar cambios genéticos adicionales en las células epiteliales prostáticas.

Con el tiempo pueden producirse otros eventos genéticos somáticos que pueden alterar más el comportamiento de la célula hasta que muestra características de malignidad: inmortalidad, independencia de factores de estimulación, inhibición de crecimiento externo, evitación de la muerte celular, invasión tisular y reclutamiento de vasos sanguíneos <sup>65</sup>.

#### GENÉTICA DE LÍNEAS GERMINALES Y CÁNCER DE PRÓSTATA

En los últimos años supone un reto científico encontrar mutaciones comunes de líneas germinales que permitan identificar grupos familiares con riesgo aumentado de CAP. Por el contrario múltiples polimorfismos de líneas germinales se han asociado con una alteración individual del riesgo de desarrollar CAP <sup>66</sup>.

Se define como polimorfismo a la variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población que afecte al menos al 1% de esta, mientras que una mutación es un cambio poco frecuente en la secuencia de bases en el ADN.

Los primeros estudios se enfocaron en los polimorfismos genéticos, en repeticiones de oligonucleótidos, o en los polimorfismos de nucleótidos únicos (*Single Nucleotids Polymorphisms*) que fueran de relevancia para las vías del metabolismo de los andrógenos. Actualmente los estudios se dirigen hacia el trabajo con asociación de

estudios genéticos (*GWAS, Genome Wide Association*), y hacia la estructura de los alelos (haplotipos)

Debido a esto en el año 2006, el análisis de polimorfismos de líneas germinales y su asociación con el cáncer de próstata permitió identificar una región en el cromosoma 8 (8q24) que tenía una relación significativa con el cáncer de próstata <sup>67</sup>. En un estudio reciente se han identificado una serie de polimorfismos que se asocian con el riesgo de desarrollar cáncer de próstata en 7 loci de los cromosomas 3, 6, 7, 10, 11, 19 y X <sup>68, 69</sup>.

El análisis genómico de los cambios somáticos en el cáncer de próstata ha permitido destacar el papel de algunos oncogenes específicos y de vías de regulación en el cáncer de próstata.

De los hallazgos más relevantes destacan la identificación de reordenamientos cromosómicos recurrentes asociados con el cáncer de próstata. Destaca la fusión del gen regulado androgénicamente *TMPRSS2* con genes *ETS* para factores de transcripción (*ERG* y *ETV1*) en cáncer de próstata <sup>70</sup>.

Esta fusión parece ser un evento molecular precoz en el desarrollo de la enfermedad, pero el significado pronóstico sigue siendo controvertido. Nam <sup>71</sup> objetivó que esta fusión se asociaba con un mayor riesgo de recidiva bioquímica en pacientes sometidos a prostatectomía radical por cáncer localizado. Attard <sup>72</sup> mostro que aquellos pacientes con un tumor caracterizado por la duplicación de la fusión *TMPRSS2-ERG* combinado con la detección de las secuencias 5' de *ERG*, tenían una supervivencia cáncer específica extremadamente pobre. Por el contrario Mehra <sup>73</sup> no encontró asociación ninguna.

Cuando se hizo la comparación de perfiles de expresión en el cáncer de próstata localizado y en el cáncer de próstata metastásico se identificó el gen *EZH2*, que esta sobrepresado en la enfermedad metastásica <sup>74</sup>.

El gen *AMARC* (Alfa-Metilacin-Coenzima A Racemasa) parece estar sobrerregulado en el cáncer de próstata, y en menor medida en la enfermedad metastásica <sup>75</sup>. Niveles bajos de *AMARC* se han asociado con mayor agresividad tumoral <sup>76</sup>.

Otros genes han sido estudiados: *MUC1* y *AZGP1*. Lapointe <sup>77</sup> refiere que la positividad de la tinción inmunohistoquímica de la proteína MUC1 se asociaba con un riesgo mayor de recidiva de enfermedad, mientras que *AZGP1* se asociaba con un menor riesgo de recurrencia. Ambos eran buenos predictores de recurrencia tumoral, independientemente del grado tumoral, del estadio y de los niveles preoperatorios de PSA.

Por otro lado se encuentran las metilaciones aberrantes del ADN. Diferentes estudios han demostrado que la presencia de islas de hipermetilación CpG en varios genes (incluyendo *GSTP1*, *P4501A1*, *APC*, *RAR-beta*) se asocian significativamente con un peor pronóstico <sup>78</sup>.

A pesar de todos los estudios que se vienen realizando sobre la genética del cáncer de próstata, aún estamos lejos de conocer la identidad genética y molecular de esta enfermedad, pero sin duda los conocimientos que vamos adquiriendo cada vez son más profundos y extensos.

## **1.5 DIAGNÓSTICO PRECOZ**

La detección precoz o cribado oportunista es el hallazgo de la enfermedad en casos individuales como resultado de un estudio dirigido. Con esto se pretende una reducción de la mortalidad por la patología.

El cáncer de próstata es un tumor que progresa de manera indetectable y, en muchas ocasiones, las manifestaciones clínicas sólo aparecen cuando la enfermedad es sistémica. Constituye un problema global importante de salud pública, ante el cual se han desarrollado programas de cribado para el diagnóstico precoz.

El antígeno prostático específico (PSA) es el marcador tumoral más utilizado para la detección del cáncer de próstata. Sin embargo, la extendida aplicación del PSA como screening ha derivado en un aumento del número de biopsias transrectales innecesarias <sup>79</sup>.

Según la revisión del SEER 2006 con un total de 71602 pacientes incluidos con cáncer de próstata, se obtuvieron tasas de sobretratamiento del 55% (45% RDT, 10% PR) y sobrediagnóstico del 15-84% <sup>80</sup>.

Se han llevado a cabo dos estudios prospectivos aleatorizados de cribado poblacional a largo plazo, uno en Estados Unidos (*Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial, PCLO*) y otro en Europa (*European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer, ERSPC*)

El PCLO se aleatorizó a 76.690 pacientes a recibir cribado anual con PSA y tacto rectal o cuidado habitual como control. La incidencia de cáncer en el grupo de estudio fue de 116 por 100.000 personas año, con una mortalidad por cáncer de 2 por 10.000 personas año, frente a 95 en el grupo control con una mortalidad de 1,7. Los resultados del estudio concluyeron que la mortalidad por cáncer de próstata fue baja en ambos grupos y que no resultó estadísticamente diferente con las medidas de cribado poblacional<sup>81</sup>.

El estudio ERSPC incluyó a 162.243 varones entre 55 y 69 años que fueron asignados de forma aleatoria a un grupo de cribado mediante PSA cada 4 años o a un grupo de control sin cribado. Tras un seguimiento de 9 años la incidencia acumulada de cáncer de próstata en el grupo de estudio fue del 8,2% y la mortalidad del 0,8 por 1.000. En el grupo control la incidencia acumulada fue del 4,8% y la mortalidad del 0,71 por 1.000. Estos datos suponen que debe llevarse a cabo cribado en 1.410 varones y tratamiento en 48 casos para prevenir una muerte por enfermedad <sup>82</sup>.

La puesta al día de un subgrupo de 20.000 pacientes del ERSPC con un seguimiento de 14 años revela una reducción en la mortalidad del 50% para el grupo de cribado.

Sin embargo este hallazgo se acompañó de un riesgo substancial de sobrediagnóstico<sup>83</sup>.

### 1.5.1 TACTO RECTAL

Es una exploración fundamental en la evaluación del paciente con sospecha de cáncer de próstata. Es económica, muy reproducible y de gran utilidad por tener un alto valor predictivo positivo (VPP) En pacientes con un PSA > 2ng/dl tiene un VPP de 5-30%<sup>84</sup>.

A pesar de esto existe una gran variabilidad interexaminador e intraexaminador. Además la mayoría de los tumores diagnosticados en la actualidad son lesiones no palpables (T1c) diagnosticadas por elevación del PSA. Un tacto rectal sospechoso es un indicador para realizar una biopsia de próstata y es predictor de cáncer de próstata más agresivo (Gleason  $\geq 7$ )<sup>85, 86</sup>.

Para esta exploración es necesaria la descripción del tamaño de la glándula, que no se correlaciona con la incidencia de cáncer, su consistencia y el carácter de su superficie. Se sospechan neoplasias si se palpan nódulos, asimetrías o masas con aumento de consistencia.

### 1.5.2 PSA

También conocido como hK3 o calicreína humana 3, el PSA fue identificado por primera vez por Hara et al. en 1971 y purificado posteriormente por Wang en 1979<sup>87</sup>. Es una glicoproteína de cadena única de 33-34 kDa, compuesta por un 93% de aminoácidos y un 7% de carbohidratos<sup>88</sup>. Es codificada por el *gen hK3*, que se localiza en el cromosoma 19. Se sintetiza en el epitelio ductal y en los acinos prostáticos<sup>89</sup>. Se encuentra en tejido prostático normal, hiperplásico, tumoral primario y tumoral metastásico de la próstata.

El antígeno prostático específico se segrega hacia la luz de los conductos prostáticos mediante exocitosis y se convierte en un componente del plasma seminal,

alcanzando el suero tras su difusión desde las células luminarias a través de la membrana basal epitelial y del estroma prostático, pudiendo atravesar la membrana basal capilar y las células epiteliales e introducirse en los linfáticos <sup>90</sup>.

Los métodos inmunohistoquímicos y de inmunoensayo de alta sensibilidad han permitido detectar la presencia de PSA en diversos tejidos y estructuras de la mujer y del hombre como las glándulas periuretrales, glándulas perianales, glándulas sudoríparas apocrinas, carcinomas apocrinos de mama, tumores salivales y en la leche materna <sup>91</sup>.

El PSA actúa como una proteasa tipo serina, con actividad proteolítica similar a la de la quimotripsina. Es segregado en la luz de la próstata y se introduce en el fluido seminal cuando éste atraviesa la glándula prostática. El PSA actúa produciendo la licuefacción de este coágulo mediante proteólisis de las proteínas formadoras de gel en fragmentos más pequeños y solubles, liberando de esta forma los espermatozoides <sup>92</sup>. Algunos autores han sugerido que, además, el PSA podría poseer actividad antiangiogénica, gracias a su acción como proteasa tipo serina <sup>93</sup>.

En plasma o suero su concentración oscila entre 0 y 4 ng/ml. Se encuentra en diferentes formas moleculares: libre o formando complejos con diferentes inhibidores plasmáticos. Entre los inhibidores plasmáticos capaces de formar complejos estables y covalentes con el PSA se encuentran la alfa1-antiquimotripsina ( $\alpha$  1ACT), que forma complejos PSA:  $\alpha$ 1ACT y la alfa2-macroglobulina ( $\alpha$  2M), que forma complejos PSA:  $\alpha$  2M <sup>94</sup>. El PSA en el complejo PSA:  $\alpha$  1ACT es enzimáticamente inactivo, mientras que el PSA en el complejo PSA:  $\alpha$  2M retiene parte de su actividad enzimática frente a pequeños sustratos. La proporción de PSA libre en el suero oscila entre el 5% y el 50% del total medido <sup>95</sup>.

Las herramientas diagnósticas del cáncer de próstata actualmente son el PSA, junto al tacto rectal y la biopsia de próstata. Debido a una extendida aplicación de estas herramientas, se ha producido un aumento del nº BTR innecesarias. Por este motivo

se han desarrollado a lo largo de los últimos años parámetros diagnósticos basados en PSA con el único objetivo de mejorar la especificidad en la detección precoz <sup>96</sup>.

Los principales parámetros diagnósticos basados en el PSA son los que se describen a continuación.

#### **1.5.2.1 Densidad PSA**

Se define como el cociente entre el PSA total sérico (ng/ml) y el volumen prostático (cm<sup>3</sup>) medido mediante ecografía transrectal. Teóricamente, la densidad de PSA podría diferenciar mejor entre HBP y CaP en pacientes con PSA entre 4 y 10 ng/ml y tacto rectal normal. Sin embargo, la prueba depende de la capacidad del explorador para medir correctamente el volumen prostático el volumen de la HBP no se relaciona necesariamente con los niveles de PSA séricos debido a que la proporción entre epitelio y estroma prostático varía considerablemente entre distintos sujetos y sólo el epitelio produce PSA. Esto explica el amplio solapamiento de valores de densidad de PSA entre pacientes con HBP y CaP. La utilidad de la densidad del PSA no se ha confirmado en todos los estudios. El hallazgo de densidades más altas en los pacientes con cáncer de próstata se debe posiblemente a que es más probable obtener biopsias positivas cuando se obtiene una cantidad constante de biopsias en sujetos con próstatas voluminosas <sup>97</sup>. Por otra parte, Catalona et al. <sup>98</sup>, en el mayor estudio multicéntrico que evalúa la eficacia de la densidad de PSA, refieren que aproximadamente la mitad de los CaP no se diagnostican utilizando este punto de corte de 0,15 ng/ml/año. Explican que para el valor de 0,15 se obtiene una sensibilidad del 59%, recomendando un punto de corte de 0,078 para conseguir una sensibilidad del 95% con una especificidad del 19%. Esta variación en los resultados puede deberse a variaciones en la cantidad de epitelio en próstatas con tamaño similar <sup>99</sup>.

### 1.5.2.2 Velocidad del PSA

Se define como el incremento de la concentración de PSA total con relación al tiempo, teóricamente mayor en el CaP que en la HBP, ya que las variaciones volumétricas del epitelio prostático son más rápidas cuando éste es tumoral. Carter et al. <sup>100</sup> establecieron que una velocidad de PSA  $\geq 0,75$  ng/ml/año es muy sugestiva de la presencia de CaP (72% de sensibilidad y 95% de especificidad) Una de las principales limitaciones que presenta es que es difícil de calcular porque no se ha establecido un único modelo matemático y por tanto existe variabilidad, pero en cambio sí es válido para seguimiento a largo plazo de pacientes de bajo riesgo y para indicar las segundas biopsias prostáticas <sup>101</sup>.

### 1.5.2.3 Formas moleculares del PSA

Los ensayos comerciales disponibles permiten detectar la concentración de PSA total, de complejo PSA:  $\alpha$  1ACT y de PSA libre.

#### A. PSA libre

El porcentaje de PSA libre es superior en pacientes con HBP que en aquellos con CaP <sup>102</sup>. El punto de corte para la tasa del cociente PSA libre/PSA total difiere de forma significativa entre ensayos. En un ensayo multicéntrico prospectivo se obtuvo cáncer de próstata en la biopsia en el 56% de los hombres con ratio libre/total  $< 0,10$ , pero solo en un 8% de los hombres con un ratio  $>$  de  $0,25$  <sup>103</sup>. Estas variaciones podrían ser debidas a los diferentes diseños de cada estudio y a diferencias en las poblaciones sujetas a estudio <sup>104</sup>. Sin embargo, parece útil a la hora de ayudar a determinar qué pacientes con un PSA ligeramente elevado no necesitan ser sometidos a biopsia.

El porcentaje de PSA libre se debe aplicar a pacientes con un PSA total menor de 10 ng/ml, ya que con PSA total mayor a 10 ng/ml aparece CaP en más de la mitad de los casos y la mejora en la especificidad disminuye significativamente la sensibilidad. En un estudio multicéntrico Catalana et al. informó que cuando se utiliza un porcentaje

de PSA libre de 25% para indicar una biopsia de próstata sextante, se obtuvo una sensibilidad del 95% para la detección de CaP y un aumento de la especificidad en un 20% con respecto a PSA por sí sola [86]. El área bajo la curva de porcentaje de PSA libre fue significativamente mayor que el de PSA total (AUC 0.72 frente AUC 0.53) <sup>103,105</sup>.

\* Isoformas del PSA libre

Hay tres isoformas distintas de PSA libre en el suero: -2 pro-PSA, PSA –asociado HBP (BPSA) y PSA libre intacto<sup>106</sup>. Los estudios han demostrado que los niveles más altos de -2 pro-PSA se asocian con CaP. En los hombres con niveles de PSA entre 6,0 y 24,0 ng / ml, el pro PSA resultó ser significativamente mayor en los hombres con CaP <sup>106</sup>. Los autores plantearon la hipótesis de que el aumento en el ratio de pro-PSA en suero con respecto al porcentaje de PSA libre podría ser impulsado por el aumento de la producción de pro-PSA a partir de células premalignas. En este año se ha aprobado por la FDA un nuevo test que se llama phi (*Prostate Health Index*), que combina PSA total, PSA libre y -2 pro PSA. Según un estudio multicéntrico publicado recientemente, realizado sobre 658 hombres con PSA entre 4-10 ng/dl y tacto rectal normal, el phi era significativamente más alto en hombres con cáncer de próstata con Gleason 7 o mayor, que el PSA total o libre en solitario. Concluían que podía ser útil como parte de un enfoque multimodal para reducir el número de biopsias y el sobrediagnostico.<sup>107</sup>

El BPSA se expresa en la hiperplasia nodular limitado a la zona de transición de los hombres con hiperplasia benigna de próstata. Puede ser detectado en el semen, sangre y próstata, y sus niveles se correlacionan con el volumen de la zona de transición y los síntomas obstructivos miccionales. El BPSA parece ser un marcador prometedor de HBP ya que se ha demostrado una asociación directa entre su secreción y el volumen de la zona de transición. Como tal, el BPSA es un mejor predictor de la hiperplasia de próstata que el PSA total y el PSA libre <sup>108, 109</sup>.

Se ha detectado una forma de pro PSA adicional que se encuentra intacta e inactiva y que no forma complejos con ACT. Se ha detectado en células de cáncer de próstata. Según algunos estudios preliminares la relación del PSA intacto con el libre podría mejorar la precisión de la detección del cáncer de próstata<sup>110</sup>.

#### **B. PSA formando complejos PSA: $\alpha$ 1ACT**

La proporción de PSA que forma complejos con  $\alpha$  1ACT es significativamente mayor en el CaP que en la HBP. En el rango de PSA entre 4 y 10 ng/ml, Okihara et al.<sup>111</sup> y Kobayashi et al.<sup>112</sup> refieren que el complejo PSA:  $\alpha$ 1ACT no discrimina mejor el CaP que el PSA total. Okegawa et al.<sup>113</sup> tan sólo pudieron demostrar diferencias significativas cuando se comparaba el PSA total con el cociente PSA:  $\alpha$  1ACT/PSA total. Saika et al.<sup>114</sup> Alapont et al.<sup>109</sup> revelan que el porcentaje de PSA formando complejo con  $\alpha$  1ACT es más eficaz que el porcentaje de PSA libre para diferenciar la HBP y el CaP en el rango de PSA total entre 2 y 10 ng/ml y que su uso es preferible al uso del porcentaje de PSA libre.

#### **C. PSA complex**

Parámetro que mide todo el PSA unido a sus diferentes inhibidores plasmáticos (PSA complejo) Parsons et al.<sup>115</sup>, en el mayor estudio multicéntrico realizado que analiza el valor del PSA complejo cuando el PSA total es menor 4 ng/ml, refieren que este parámetro aumenta la especificidad de manera considerable con respecto al PSA total, y a valores equiparables a los del cociente PSA libre/PSA total. Para sensibilidades del 90% y 95% con el PSA complejo obtienen especificidades de 25,6% y 20,1% respectivamente, mientras que con el PSA total serían de 11,1% y 9,8%. Sin embargo, Lein et al.<sup>116</sup> y Jung et al.<sup>117</sup> no encuentran ventajas del PSA complejo con respecto al PSA total, aunque las poblaciones estudiadas y los ensayos para medir el PSA total fueron distintos. Lein et al.<sup>116</sup> sí que describen estas ventajas cuando analizan el cociente PSA complejo/PSA total. Otros autores que han estudiado este cociente refieren que no aporta mejores resultados que el PSA total<sup>118</sup>.

## 1.6 BIOMARCADORES

En los últimos años dada la falta de especificidad de los marcadores que se usan actualmente para el diagnóstico precoz del cáncer de próstata, se está llevando a cabo una ardua tarea en investigación para lograr biomarcadores que ayuden al diagnóstico temprano, estadificación y monitorización de la enfermedad, y nos ayuden a un empleo adecuado de armas terapéuticas con una disminución de la tasa de biopsias innecesarias (Figura 1-11)

Para que un nuevo biomarcador pueda ser clínicamente útil, tiene que responder a una pregunta clínicamente relevante y proporcionar información que no está disponible de manera más sencilla y rentable. Cualquier nuevo biomarcador necesita proporcionar un beneficio sobre estos criterios estándar o al menos mejorar su precisión. Antes de que un ensayo de un biomarcador pueda ser implementado en el entorno de la comunidad, se necesita abordar cuatro conceptos: "*mejor, más fácil, más rápido y más barato*" <sup>119</sup>.

Por tanto se puede resumir la definición de marcador de cáncer de próstata (al igual que en el resto de neoplasias) en los siguientes puntos:

- Expresarse de forma aumentada en caso de enfermedad
- Cuantificable en fluidos biológicos/muestras clínicas
- Mostrar alguna correlación con la enfermedad
- Económico, rápido y consistente

# TIPOS DE MARCADORES

## 1. MARCADORES BIOMOLECULARES

### GLICOPROTEÍNA HK2

CICLO CELULAR	Inhibidores endógenos de las CDK: ↑↓ p16 INK4A, p21WAF1, p27Kip1
APOPTOSIS	Sobreexpresión p53 y Bcl-2
SEÑAL DE TRANSDUCCIÓN	Expresión alterada de receptores tirosín-quinasa de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR): EGFR Y HER-2
ADHESIÓN CELULAR	Sobreexpresión e infraexpresión de E-cadherina
ANGIOGÉNESIS	Sobreexpresión de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y factor vascular endotelial (VEGF). Alta densidad microvascular

## 2. CONTAJE DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES (CTC)

## 3. MARCADORES CITOGENÉTICOS

### GENÉTICA LINEAS GERMINALES

EVENTOS SOMÁTICOS	Reordenamientos cromosómicos recurrentes: fusión del gen TMRSS2 con genes ETS para factores de transcripción (ERG y ETV1), <b>PCA3</b> , GSTPI, AMARC, MUC1, AZGP1
-------------------	--

Figura 1-11 Clasificación de Biomarcadores

### 1.6.1 CALICREINA HUMANA 2

Las calicreinas del tejido humano (KLKs) constituyen una única familia de 15 serin proteasas con actividad tripsina o quimotripsina codificadas por un clúster de gran tamaño (*KLK1-15*) en el locus cromosómico 19q13.4<sup>119</sup>. Las calicreinas generalmente se dividen en dos grupos: clásicas y no clásicas. El término clásica se refirió a los primeros miembros de la familia de calicreinas humanas que fueron identificados, a saber *KLK1*, *KLK2* y *KLK3* (PSA), mientras que el resto se refiere a menudo como no clásicas<sup>120, 121</sup>.

Las calicreinas se expresan en una amplia variedad de tejidos, incluyendo el páncreas, corazón, pulmón, sistema nervioso central, las glándulas salivales y tejidos de regulación endocrina tales como tiroides, mama, testículo, ovario, próstata, lo que indica que participan en importantes procesos biológicos. De hecho, existen varias evidencias que apoyan que las calicreinas cooperan en las vías de complejas cascadas

proteolíticas para regular los procesos fisiológicos y patológicos <sup>122, 123</sup>. Por ejemplo, *KLK5*, *KLK7* y *KLK14* están involucradas en la descamación de la piel y otras enfermedades de la piel mientras *KLK2*, *KLK3* y *KLK5* han participado en la licuefacción seminal plasma <sup>122, 123</sup>. De relevancia es también que las calicreinas están implicadas en diferentes etapas del desarrollo y progresión del cáncer y han surgido como potentes marcadores tumorales.

La calicreína glandular humana 2 es expresada por el gen *KLK2*. Además de pertenecer a la misma familia de proteasas séricas, el PSA y la hK2 comparten numerosas propiedades. Las secuencias de aminoácidos del PSA y la hK2 son idénticas aproximadamente en el 80% <sup>124</sup>. Ambas se expresan en el epitelio prostático y están presentes en el suero y el líquido seminal <sup>125, 126</sup>. Además, sus expresiones están reguladas por los andrógenos <sup>127</sup>.

A pesar de estas similitudes, hK2 y PSA difieren en su actividad enzimática. Desde que la covarianza de hK2 y PSA es menos de 60% y ambos marcadores demuestran diferentes patrones de expresión a nivel de inmunohistoquímica, hK2 se considera un marcador independiente de PSA. Los niveles de hK2 en próstata, semen, y suero están a menos del 2% en comparación con el PSA <sup>128, 129</sup>.

En el suero, el PSA y la hK2 forman complejos con los inhibidores endógenos de la proteasa. La hK2 se encuentra en el plasma en diversas formas moleculares, al igual que el PSA. Parte de la hK2 está en forma libre de unos 32 kDa, que es la forma más frecuente en plasma o suero, mientras que otra parte se encuentra formando complejos con  $\alpha$  1ACT y  $\alpha$  2M. Los ensayos disponibles actualmente para la medida de la concentración de hK2 que emplean anticuerpos monoclonales detectan la hK2 libre y el complejo hK2:  $\alpha$  1ACT <sup>128</sup>. Aunque la hK2 forma fácilmente complejos con la  $\alpha$  2M in vivo e in vitro igual que el PSA, los anticuerpos monoclonales disponibles actualmente no lo detectan en una cantidad significativa.

La expresión de la hK2 está localizada en la próstata y es más específica del tumor que el PSA. Así, a diferencia del PSA, la hK2 se expresa a niveles más altos en el tejido prostático poco diferenciado que en el bien diferenciado o benigno <sup>130</sup>.

También se ha comprobado que la concentración del precursor de la hK2 (pro hK2) está aumentada en suero de pacientes con CaP y en el tejido prostático canceroso comparado con el tejido de la HBP o el tejido prostático normal <sup>130</sup>.

Los informes iniciales mostraron que, aunque los pacientes con cáncer de próstata y HBP no mostraron diferencias significativas en los niveles de hK2, la relación de hK2 y el PSA libre (% hK2) aumentó la precisión sobre el porcentaje de PSA libre para discriminar cáncer de próstata y HBP en hombres con PSA entre 4- 10 ng / ml <sup>131</sup>. Posteriormente, varios grupos informaron que el % hK2 contribuyó a una mejor discriminación entre el cáncer de próstata y los pacientes no oncológicos <sup>131, 132</sup>. Según refería Becker et al, en combinación con el PSA libre y PSA total se puede obtener una mejor diferenciación entre HBP y CP <sup>131</sup>. Publicaron que el valor medio de hK2 y las razones  $hK2 / PSA \text{ libre}$  y  $hK2 \times PSA \text{ libre} / PSA \text{ total}$  eran significativamente superiores en CP comparados con HBP. Sin embargo, otros autores informaron de que el valor predictivo del % hK2 puede no ser mayor que el % PSA libre <sup>133</sup>. Mientras tanto, se ha sugerido que hK2 también podría ser útil para predecir el estadio patológico y el grado junto con los resultados bioquímicos en pacientes tratados con prostatectomía radical <sup>134, 135, 137</sup>. Vickers et al afirmaron que hK2 podía predecir peor diferenciación tumoral, extensión extracapsular y RB en pacientes operados mediante PR en CP clínicamente localizado. Así mismo referían que hK2 predice más fuertemente que el PSA total la extensión extracapsular y la invasión de vesículas seminales (AUC = 0,662 y 0,719) <sup>134, 135, 136</sup>.

## COMBINACION DE hK2 Y FORMAS MOLECULARES DEL PSA

Es improbable que un solo biomarcador tenga la capacidad de ser usado como método diagnóstico y / o pronóstico de una patología particular. El futuro de los perfiles del cáncer se basa en la combinación de un panel de biomarcadores complementarios que pueden dar la estadificación molecular precisa e indicar la probabilidad de comportamiento agresivo <sup>138</sup>.

El grupo de Vickers y Lilja ha desarrollado un modelo estadístico que predice los resultados de la biopsia de próstata basado en la edad, el tacto rectal y un panel de cuatro calicreínas como marcadores - PSA total, PSA libre, PSA intacto y hK2, que podría reducir el número de biopsias transrectales disminuyendo así las complicaciones y el coste. Utilizando datos de la prueba de detección aleatorizada del cáncer de próstata en Gotemburgo, Suecia [un centro del Estudio Aleatorio Europeo de Cáncer de Próstata (ERSPC)], se estima que por cada 1.000 hombres sin screening previo con PSA total elevado, el uso del modelo para determinar la realización de la biopsia reduciría las tasas de biopsia por 573, mientras que tan solo se pierden un pequeño número de cánceres (31 de 152 cánceres de bajo grado y 3 de 40 cánceres de alto grado) (AUC de 0,65 a 0,83)<sup>139</sup>. Estos resultados se repitieron posteriormente en una cohorte independiente (reducción de la biopsia en 513 por cada 1.000 hombres con PSA total elevado, perdiendo 54 de 177 cáncer de bajo grado y 12 de 100 cánceres de alto grado) <sup>140</sup>. Estos resultados también se han verificado en un total de 1501 pacientes con aumento posterior de PSA (pacientes con cribado normal de PSA que incremento en 2º-3º vuelta del EUREP) <sup>141, 142</sup>. Recientemente, Gupta et al. demostraron que el panel de cuatro calicreínas podía predecir el resultado de la biopsia de próstata en los hombres que habían sido sometidos previamente a la biopsia de próstata durante el cribado anterior <sup>143,144</sup>. Este modelo, añadiendo la edad y el tacto rectal mejoró sustancialmente la precisión predictiva del modelo de base (que comprende de PSA total, la edad y tacto rectal), tanto para los cánceres de bajo como de alto grado. Este modelo se replicó en la cohorte de Rotterdam,

Gothenburg y Francia demostrándose la capacidad predictiva del modelo de calicreinas <sup>145</sup>.

Este modelo concluyo posteriormente en una cohorte sueca de 943 pacientes con PSA  $\geq 3$ , sin screening previo, que los pacientes que tras la aplicación del modelo predictivo se definían como pacientes con riesgo bajo, tenían una escasa probabilidad de desarrollar un cáncer incurable (AUC 0,65  $p < 0,001$ ) <sup>146</sup>.

En 2013 Carlsson et al <sup>147</sup> publicaron que el modelo de las cuatro calicreinas era capaz de distinguir y predecir cáncer avanzado de insignificante y ayudaba a evitar cirugías innecesarias.

En este último año se dispone de una test llamado 4Kscore. Este test combina las cuatro calicreinas (PSA total, PSA libre, PSA intacto y hK2) y es capaz de identificar el riesgo real de cáncer de próstata agresivo para el paciente, incluyendo la patología del cáncer de próstata de alto grado con alta sensibilidad y alto valor predictivo negativo. Esta prueba ha sido desarrollada basándose en todos los estudios sobre las diferentes cohortes que demostraban la capacidad predictiva de este modelo de calicreinas <sup>148</sup>.

## OTRAS CALICREINAS

Algunos autores refieren que niveles altos del mRNA de la calicreina tipo 4 (*KLK4*) obtenidos mediante biopsia de próstata se correlacionan con un Gleason mayor y mayor estadio <sup>149</sup>.

La calicreina tipo 5 (*KLK5*) se sobreexpresa en tejidos benignos prostáticos, y se ha visto además una relación inversa entre los niveles de la *KLK5* y el estadio y el grado tumoral. Mientras tanto niveles elevados de la calicreina 11 (*KLK11*) se han encontrado asociados con estadios menos avanzados, menor Gleason y un buen pronóstico de la enfermedad <sup>149</sup>. La expresión de la calicreina 14 (*KLK14*) que tiene un papel importante en la licuefacción del coagulo seminal, indica un resultado adverso

en la enfermedad ya que se relaciona con tumores prostáticos más agresivos. La sobreexpresión de la calicreina tipo 15 (*KLK15*) incluyendo todas sus variantes de transcripción, se observa con el cáncer de próstata más agresivo <sup>150</sup>.

### **1.6.2 BIOMARCADORES DEL CICLO CELULAR**

Las aberraciones en la progresión de la fase G1 a la fase S se manifiestan en muchos tumores. Los inhibidores endógenos de las CDK (complejos ciclina-quinasa) son los principales afectados: el p27, p21 y p16.

Algunos estudios muestran que un aumento en la expresión de p16 se asocia a un mayor porcentaje de recidiva bioquímica y de progresión de la enfermedad <sup>151</sup>. Otros hablan de que una expresión baja de este inhibidor se asocia con tasas mayores de progresión local y metastásica <sup>44</sup>.

Con respecto al p21 Rigaud <sup>152</sup> público que una sobreexpresión se asociaba de forma independiente con mayor tasa de recidiva bioquímica <sup>152</sup>.

### **1.6.3 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA APOPTOSIS**

Las células humanas disponen de dos vías principales de apoptosis: la extrínseca y la intrínseca o mitocondrial. Los principales reguladores de esta última son la familia de proteínas p53 y Bcl-2.

La sobreexpresión de p53 en las biopsias preoperatorias de pacientes operados de cirugía radical de próstata se asoció con un riesgo aumentado de recidiva bioquímica <sup>153</sup>. Más tarde Che et al confirmo la asociación independiente de niveles elevados de expresión de p53 con un mayor riesgo de progresión metastásica y con una menor supervivencia cáncer específica en pacientes tratados con radioterapia <sup>154</sup>.

Con respecto a la expresión de Bcl-2 en el cáncer de próstata, existen resultados contradictorios. En algunos estudios se objetivo que la sobreexpresión de Bcl-2 se asociaba con una mayor tasa de recidiva bioquímica en pacientes sometidos a

prostatectomía radical <sup>153, 155</sup>. En otros no se evidenciaron diferencias significativas. Sin embargo recientemente se ha publicado una asociación entre la sobreexpresión de Bcl-2, un aumento en la tasa de progresión metastásica y una menor supervivencia global en pacientes del ensayo RTOG-9202<sup>156</sup>.

#### **1.6.4 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA SEÑAL DE TRANSDUCCIÓN**

Las alteraciones en esta vía son algo común en los cánceres. En el cáncer de próstata están presentes las alteraciones en la expresión de los receptores tirosin-quinasa que pertenecen a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), como EGFR y HER-2.

Con respecto a HER-2 algunos autores hallaron asociación entre la amplificación del gen HER-2 y la recidiva bioquímica tras prostatectomía radical. Fossa et al publicaron que la sobreexpresión de HER-2 se relacionaba con una peor evolución clínica en términos de progresión bioquímica y clínica y de supervivencia en pacientes tratados con radioterapia <sup>157</sup>.

#### **1.6.5 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA ADHESIÓN CELULAR**

En la adhesión celular y cohesión existen unas moléculas llamadas cadherinas que están alteradas en el cáncer de próstata. Estas son la E-cadherina y la N-cadherina.

Con respecto a la expresión de la e-cadherina Rhodes et al publicaron un estudio que mostro que la sobreexpresión de E-cadherina se asociaba significativamente con un peor pronóstico <sup>158</sup>. Por el contrario en otro estudio se publicaba que niveles bajos de estas cadherinas se asociaban de forma potente con la progresión de la enfermedad <sup>159</sup>.

### **1.6.6 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA ANGIOGÉNESIS**

La neoangiogenesis es imprescindible para el crecimiento y propagación metastásica del cáncer. Algunos autores muestran que la sobreexpresión de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y factor vascular endotelial (VEGF) se relaciona con un peor pronóstico después de la cirugía en términos de mayor tasa de recidiva bioquímica y progresión local <sup>160</sup>.

### **1.6.7 CONTAJE DE CELULAS TUMORALES CIRCULANTES**

Las células tumorales circulantes pueden ser detectadas incluso antes que el tumor donde se originan e incluso se identifican y a menudo persisten después de que el tumor se ha extirpado. Por eso la determinación de CTC abre nuevos caminos en la evaluación de la respuesta de los cánceres ante las diferentes terapias de forma individual y precisa <sup>151</sup>.

### **1.6.8 CITOGENÉTICOS**

Como ya se ha relatado anteriormente la investigación en la genética del cáncer de próstata está siendo uno de los objetivos sobre el que trabajar hoy en día para conseguir dilucidar la genética de líneas germinales o mutaciones genéticas que se asocien fuertemente con el cáncer de próstata.

Un papel destacado en la investigación de este campo en los últimos años lo tiene el PCA 3. Un ARN no codificante producido casi exclusivamente en la próstata, que ha demostrado estar producido en exceso en los tejidos de CaP, incluyendo metástasis, en comparación con el tejido hiperplásico<sup>162</sup>. Varios ensayos pueden medir mRNA PCA3 en el sedimento de orina. La prueba que está disponible comercialmente es APTIMA (Gen-Probe), que utiliza la transcripción mediante amplificación<sup>163</sup>.

La puntuación del PCA3 se deriva de la normalización de la concentración del mRNA del PCA3 con respecto a la concentración de PSA. Un estudio multi-institucional

reciente de los pacientes sometidos a biopsia que incluyó el análisis de PCA3 en orina evacuada después de un masaje prostático, utiliza un punto de corte de PCA3 de 58, y obtuvo un área bajo la curva ROC (AUC) de 0,66, en comparación con una AUC de 0,57 para PSA <sup>164</sup>. En un estudio de 233 pacientes que fueron sometidos a biopsia de repetición después de un resultado negativo en la biopsia, la puntuación de PCA3 obtuvo una AUC de 0,68 y una sensibilidad diagnóstica y especificidad de 58% y 72%, respectivamente <sup>165</sup>. Esta prueba es potencialmente útil para mejorar la especificidad de diagnóstico del PSA. Según un trabajo publicado, la combinación de PCA3 y otros 3 biomarcadores urinarios (*GOLPH2*, *SPINK1*, y *TMPRSS2*: gen de fusión *ERG*) mejoró la sensibilidad y especificidad de diagnóstico de cáncer de próstata, sobre PCA3 solo <sup>166</sup>.

#### **1.6.8.1 Gen fusión *TMPRSS2* con genes *ETS* para factores de transcripción**

Los reordenamientos genéticos han sido implicados en neoplasias malignas hematológicas particularmente. Uno de estos genes implica el reordenamiento del factor de transcripción *ERG* [virus de la eritroblastosis v-ets E26 homólogo de oncogén (avian)] (21q22.2) y *ETV1* (variante de ets 1) (7p21.1) y el gen que codifica la serina proteasa anclada a la membrana *TMPRSS2* [*TMPRSS2* (proteasa transmembrana, serina 2), ubicado en 21q22.3]. Este reordenamiento se demostró que se produce en el 80% de los cánceres mediante análisis de perfil atípico <sup>167</sup>. Los productos de fusión de estos genes se han observado en el 42% de los pacientes con cáncer de próstata, en el 20% de los pacientes con neoplasia intraepitelial prostática (PIN), y rara vez en la HBP <sup>168</sup>. Un estudio prospectivo que siguió a 252 hombres con estadio T1a / b de cáncer prostático durante 9 años mostró que el gen de fusión *TMPRSS2: ERG* se asoció más que el gen *TMPRSS2: ETV1* con Gleason score  $\geq 7$ , enfermedad metastásica, y la muerte por cáncer <sup>169</sup>. Una isoforma de la fusión *TMPRSS2: ERG* ha demostrado por fluorescencia en el análisis de hibridación in situ estar presente en el 80% -95% de los tejidos con cáncer de próstata, y esta isoforma podría ser un objetivo potencial para terapias posteriores. Además, la sobreproducción de *SPINK1*, una serina proteasa que ha demostrado promover la

invasión tumoral en pacientes negativos para reordenamientos de *ERG* y *ETV1*, recientemente ha sido asociada con un pronóstico adverso <sup>170</sup>.

#### **1.6.8.2 Hipermetilación de la glutatión s-transferasa**

La hipermetilación en regiones ricas en dinucleótidos de citosina / guanina (CpG) han sido implicados en CaP. La glutatión S-transferasa es una enzima que protege el ADN del daño de los radicales libres. La reducción de expresión del gen *GSTP1* (glutatión S-transferasa pi 1) debido a la hipermetilación del promotor se ha mostrado de manera consistente en el cáncer de próstata y se ha medido en el sedimento de orina para determinar la necesidad de una biopsia <sup>171</sup>. Este ensayo se ha mejorado mediante la aplicación de un masaje prostático antes de la recolección de orina <sup>172</sup>. Los paneles de genes, incluyendo *GSTP1*, se han estudiado de una manera similar.

#### **1.6.8.3 Polimorfismos genéticos**

El cáncer de próstata tiene un elevado componente hereditario: un 42 % de probabilidad de herencia. El efecto acumulativo de los diferentes polimorfismos genómicos deriva en uno o más eventos genéticos y/o ambiente genético para cambios genéticos en células prostáticas epiteliales. Con el tiempo pueden ocurrir más eventos somáticos que pueden alterar la célula y adquirir características de malignidad. De esto se deriva el estudio de la genética de líneas germinales.

Como la búsqueda de mutaciones comunes de líneas germinales hasta el momento ha resultado en fracaso, las investigaciones se centran en los numerosos loci que se asocian con la susceptibilidad de padecer cáncer de próstata.

Se han identificado 7 loci relacionados en los cr3, 6, 7q, 8q24, 10, 11 y **19** <sup>173</sup>, tres contenían genes que codificaban la mayor cantidad de productos secretores de la próstata <sup>174</sup>: *KLK2* (codifica hK2), *KLK3* (codifica PSA) <sup>175</sup>, y *MSMB* codifica beta microseminoproteína<sup>176</sup>. Existe relación entre los polimorfismos de estos genes y riesgo de padecer CP. Sin embargo explican el 15% del riesgo familiar CP <sup>177</sup>.

Nam et al en 2003 <sup>178</sup> examinaron la relación que podría existir entre la sustitución de un alelo salvaje o común C por otro mutante T en el gen de la calicreína humana 2 (*KLK2*), los niveles de hK2 en sangre y el riesgo de tener cáncer de próstata. Estudiaron un total de 1287 pacientes a los que se les realizó una biopsia de próstata por elevación del PSA. Fue un estudio de casos controles. El polimorfismo a estudio fue un polimorfismo de nucleótido único para el gen de la calicreína humana-2 (*KLK2*) que codifica para la proteína hK2 y se había descrito que consistía en un cambio de nucleótido de citosina a timina en el exón 5. In vitro, los alelos codifican para una forma activa y una inactiva de la proteína producto. El alelo común C codifica para Arg226-hK2, que tiene actividad similar a la tripsina; mientras que el alelo variante T codifica para Trp-226 hK2, que no tiene actividad detectable <sup>179</sup>. A este cambio se le denominó polimorfismo rs 198977. Encontraron una asociación fuertemente positiva entre el gen *KLK2*, los niveles séricos hK2, y el riesgo de cáncer de próstata. Tanto los niveles séricos de hK2, como el de genotipo de *KLK2* predecían de forma independiente la presencia de cáncer de próstata, con el nivel de hK2 teniendo la asociación más fuerte. En combinación, el perfil hK2 demostró la odds ratio más alta para la detección del cáncer de próstata (13,92; 95% CI, 6.6 to 29.2; P.0001) y el aumento del valor predictivo positivo para la detección del cáncer de próstata. La combinación del polimorfismo *KLK2* rs 188977 C / T y los niveles de hK2 en suero pueden ayudar en la selección de pacientes para la biopsia de próstata y distinguen aún más el que los pacientes sean candidatos para una segunda biopsia si la primera biopsia es negativa. La combinación del gen *KLK2* y los niveles en suero de hK2 aumentan el valor predictivo positivo además de los factores establecidos de riesgo actuales para el cáncer de próstata, incluyendo la edad, Nivel de PSA y tacto. En particular, entre los pacientes que tenían un bajo valor predictivo positivo para el cáncer de próstata basado en estos factores (edad < 70 años, PSA <10 ng / ml, y nódulo no palpable en tacto rectal), el efecto del gen *KLK2* y el nivel de hK2 en suero casi se duplicó el valor predictivo positivo. Este podría ser utilizado para identificar subgrupos de hombres que están en alto y bajo riesgo de tener cáncer de próstata.

Observaron que el riesgo de padecer cáncer era mayor en los pacientes con el alelo T que los que tenían el alelo C. Además paradójicamente observaron que este alelo se relacionaba con niveles de hk2 más bajos. Así, la producción aumentada de niveles de hk2 en las células cancerosas podría tener una pronunciada relación con el riesgo de padecer cáncer de próstata en pacientes con niveles basales bajos de hk2 (pacientes con genotipo TT) comparados con pacientes con niveles de hk2 basales más altos (CC) <sup>178</sup>.

En 2006 Nam<sup>177</sup> et al examinaron la relación que existía entre varios polimorfismos del gen *KLK2* y los niveles de hk2 con la susceptibilidad de padecer cáncer de próstata. Secuenciaron un total de 12 polimorfismos del gen *KLK2* analizados en 20 pacientes con cáncer de próstata de alto riesgo (Figura 1-12) La genotipificación de estos SNPs entre los 1.251 sujetos reveló heterocigosidad para alelo insignificante en cinco de ellos que se excluyeron, así como otros que no estaban en equilibrio Hardy-Weinberg. Así pues quedaron cinco polimorfismos para correlacionar con hk2 y cáncer de próstata. Estos eran rs2664155, rs2664156, rsKLK3, rs198972, rs198977.

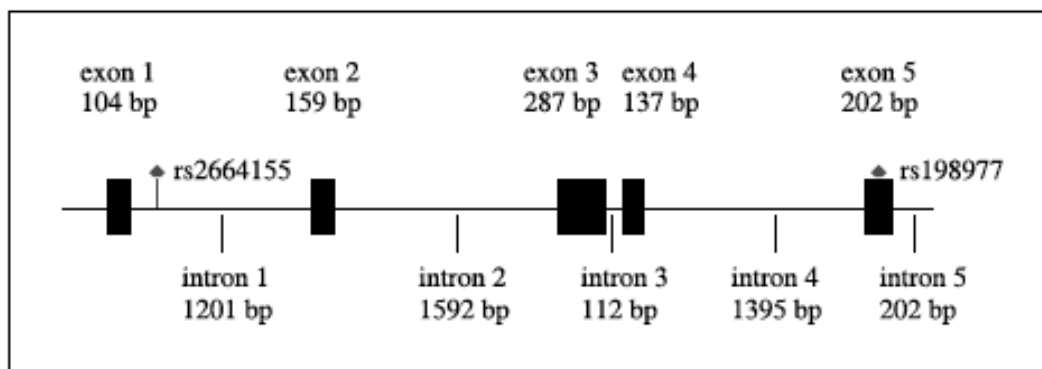


Figura 1-12. Estructura genética de *KLK2* localizada en el cromosoma 19q13.41. Consiste en cinco exones (cajas negras) y está constituida por 226 aminoácidos. SNP5 (rs198977) está localizado en exón 5

El resultado de este estudio fue que entre los hombres que se sometieron a una biopsia de próstata, encontraron fuertes asociaciones entre dos SNPs del gen *KLK2* (rs 2664155 y rs198977), los niveles séricos hk2, y el riesgo de cáncer de próstata. Estos dos polimorfismos individuales del gen *KLK2* y las combinaciones de haplotipos se

correlacionaron positivamente con los niveles séricos de su producto proteico (hK2) y se asociaron positivamente con un aumento de la probabilidad de tener cáncer de próstata en el momento de biopsia independientemente de otros factores de riesgo para el cáncer de próstata. Además, en un pequeño subconjunto de los hombres con altos niveles de hK2 y que tenían la variante de haplotipos del gen *KLK2*, todos los pacientes tenía cáncer de próstata. Este es el primer informe que describe esta asociación con el gen *KLK2* y riesgo de cáncer de próstata.

En 2009 se publicó un trabajo en el que se mostró un mapa detallado de las variaciones genéticas más comunes alrededor del gen *KLK3*. El análisis proporciona un amplio inventario de la variación genética común en la región entorno al gen *KLK3* y permite la selección de diferentes polimorfismos para ser utilizados en estudios de seguimiento para examinar la asociación de polimorfismos genéticos en el cromosoma 19q13.33 con el riesgo de cáncer de próstata y los niveles de PSA <sup>180</sup>.

Entre 2007-2009 emergieron los estudios del GWAS (*Genome Wide Association*) que surgieron como un potente y nuevo acercamiento a la identificación de alelos comunes sin previo conocimiento de su función <sup>181</sup>. Las frecuencias genotípicas se comparaban entre casos y controles en gran número de polimorfismos elegidos para informar sobre las variantes comunes más conocidos en el genoma. Se analizaron un total de 541.129 polimorfismos en un estudio de casos-controles dividido en dos fases. Identificaron 7 loci que asociaban con cáncer de próstata en los cromosomas 3, 6, 7, 10, 11, 19 y X. Confirmaron también la asociación existente entre cáncer de próstata y los alelos comunes de los cromosomas 8q24 y 17q <sup>181, 182</sup>. Más tarde en un estudio multicéntrico francés <sup>183</sup> se corroboró que dos polimorfismos situados en el cromosoma 8 (rs 1447295 y rs 6983267) se asociaban con la presencia de cáncer de próstata. Hallaron también una asociación muy significativa con el riesgo de padecer cáncer de próstata con un polimorfismo del gen *MSMB* situado en el cromosoma 10.

En 2010 se continuó estudiando sobre el gen *MSMB*. El grupo de Klein <sup>184</sup> estudió la asociación de un polimorfismo del gen *MSMB* que produce la beta semino proteína

(rs 10993994) con los niveles de PSA, hk2 en sangre y semen. Concluyeron que este polimorfismo estaba significativamente asociado con los niveles en sangre y semen de la beta semino proteína y PSA, y los niveles en semen de hk2. Así mismo referían que el alelo de riesgo para cáncer de próstata estaba consistentemente correlacionado con un aumento del PSA total y libre y con niveles disminuidos de la beta semino proteína.

Este mismo grupo <sup>185</sup> en 2010 replica en un estudio de casos y controles realizado en dos fases independientes la asociación ya demostrada por Nam et al en 2003 y 2006 del polimorfismo rs 198977 del gen *KLK2* con el cáncer de próstata. Klein et al demuestran que la asociación entre este polimorfismo y el riesgo de cáncer de próstata se hace más patente añadiendo los niveles de hk2 como factor independiente. Además concluyeron que el alelo T en rs 198977 se asociaba con un mayor riesgo de cáncer de próstata y una disminución de los niveles de hk2 en sangre junto con un porcentaje de psa libre mayor.

En 2013 se publicó un metaanálisis con un total de seis estudios (englobados los estudio de Nam y Klein) que cumplieron los criterios de inclusión, que incluyó a 5.859 casos y 4.867 controles de CaP. Sugiere que rs198977 de *KLK2* se asocia con la susceptibilidad de CaP en caucásicos y el alelo T podría aumentar el riesgo de CaP en caucásicos <sup>186, 187</sup>.

Tras toda la gran evolución que suponen estos estudios para la genética del cáncer de próstata todavía hay que estudiar el grado en el que estos polimorfismos incrementen la precisión del PSA y otras caliceínas, como marcadores predictivos de cáncer de próstata<sup>188</sup>.

## 1.7 BIOPSIA DE PRÓSTATA Y TÉCNICAS DE IMAGEN

### 1.7.1 BIOPSIA DE PRÓSTATA GUIADA POR ECOGRAFÍA

La biopsia de próstata es el método estándar para obtener la histología prostática. Se realiza cuando el PSA se mantiene en cifras elevadas (>4ng/dl) o existe un tacto rectal sospechoso.

Para evitar biopsias innecesarias y minimizar riesgos se tienen en cuenta los rangos de PSA por edad y otros parámetros como la fracción libre de PSA. Los rangos de PSA por edad implican que se eleva el punto de corte del PSA cuanto mayor sea la edad debido al aumento del volumen prostático asociado. Así se aumenta el valor predictivo de la prueba pero se reduce la tasa de detección (Figura 1-13)

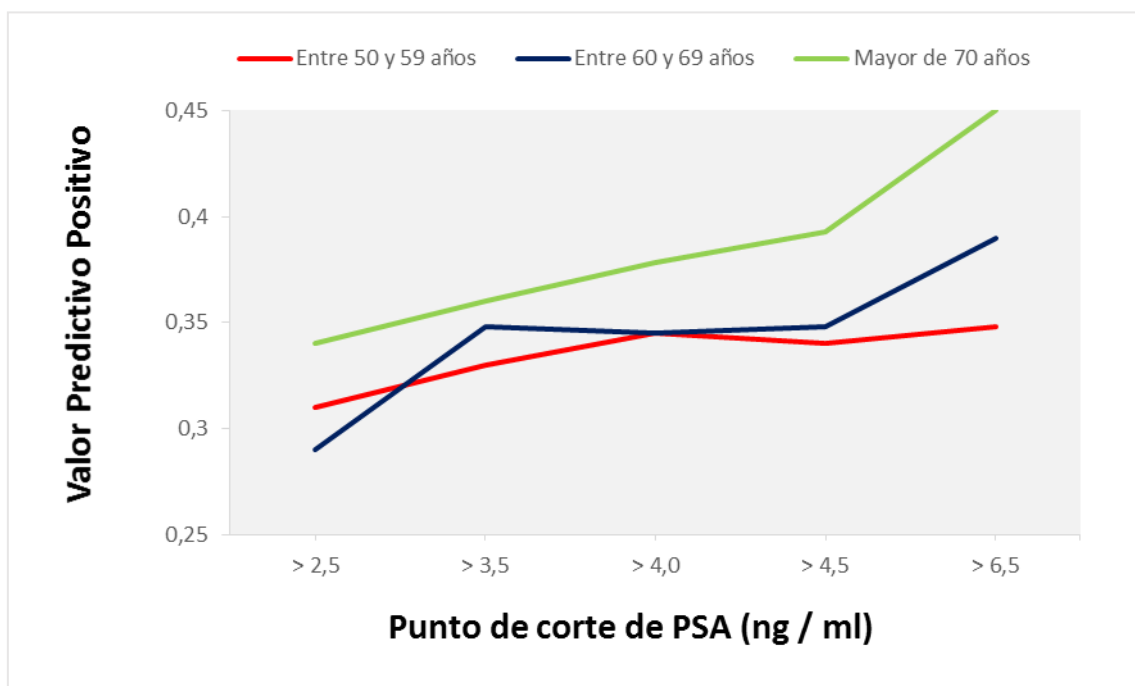


Figura 1-13. Tomada de Guías Prácticas en Urología 2013. Editorial Elsevier. Valor predictivo positivo en función del PSA total.

Durante casi un siglo, el examen rectal digital (DRE) era la única herramienta disponible para ayudar en la toma de muestras de tejido para el diagnóstico de cáncer de próstata (CaP) <sup>189</sup>. Con la llegada de la ecografía en los años 80-90, los médicos tenían una nueva modalidad para dirigir las agujas de biopsia en tiempo real

(Figura 1-14) Originalmente desarrollado por Stamey, el método sextante transrectal guiada por ultrasonido se adoptó ampliamente<sup>190</sup>. Desde ese momento, a pesar de la toma de muestras adicionales (normalmente un total de 12) y de usar anestesia local, el procedimiento sistemático se sigue realizando prácticamente sin cambios.

El número de muestras que han de obtenerse en la biopsia ha sido un tema a debate en los últimos 20 años. En el año 1989 Hodge et al <sup>190</sup> definen el primer esquema de biopsia múltiple aleatorizado que se basó en que la longitud del cilindro obtenido (1,5cm) cubría la mayor parte de la distancia entre la pared del recto y el estroma fibromuscular anterior, y que la toma de muestras desde la pared anterior del recto ofrece mejores posibilidades de un muestreo sistemático. Propusieron la obtención de tres muestras por lóbulo equidistantes de la línea media y el borde prostático separadas 1 cm entre ellas.

Más tarde en 1995 Stamey et al <sup>191</sup>, se basó en el estudio topográfico de las piezas de prostatectomía para recomendar la lateralización de las muestras de biopsias para incluir los cuernos anteriores de la zona periférica donde asentaban un elevado número de tumores.

Desde ese momento ha habido debate sobre el número y tamaños de las muestras siendo uno de los factores a estudio en tamaño de la próstata. También se han planteado varias preocupaciones en relación con el aparente incremento de las complicaciones infecciosas secundarias a un mayor número de resistencias a las quinolonas <sup>192</sup>.

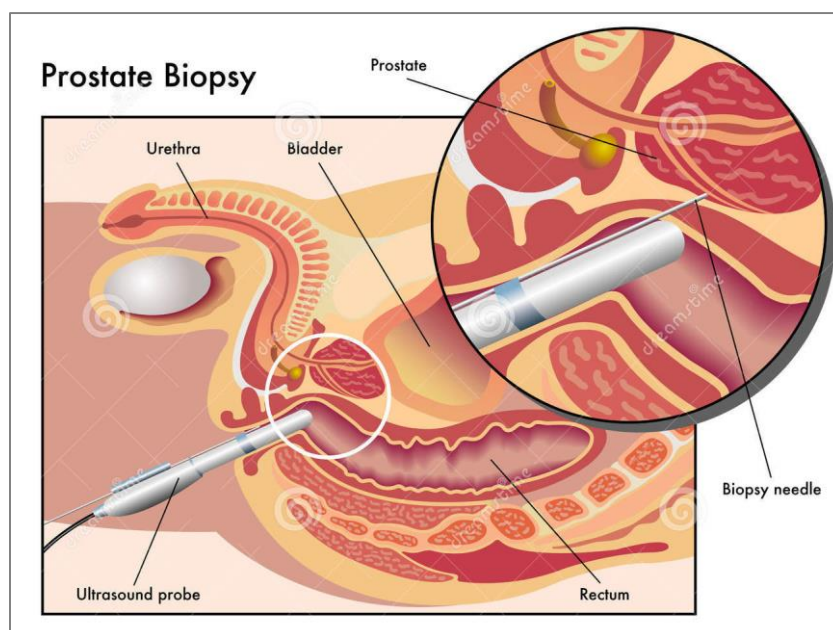


Figura 1-14. Imagen tomada de Dreamstime.com. Sonda de ecografía transrectal.

Tal y como rezan los cambios de tendencia en el número de muestras a lo largo de los años las recomendaciones han ido cambiando. En el año 2001 la recomendación era la biopsia sextante lateralizada según indicaba Presti<sup>193</sup>. Esta indicación se mantiene en el año 2005 añadiendo que esquemas más amplios pueden incrementar el diagnóstico pero que lo más importante es la localización de las muestras. Ya en el año 2008 se recomendaba obtener al menos 10 cilindros o emplear el nomograma de Viena<sup>194</sup>. El nomograma de Viena indica el número de idóneo de muestras que se deben obtener según el volumen prostático y la edad del paciente (Tabla 1-2) Aumentar el número de biopsias a la par que el volumen prostático disminuye la tasa de falsos negativos de la biopsia<sup>195</sup>.

Tabla 1-2. Nomograma de Viena

Volumen Prostático	<50 años	51-60 años	61-70 años	> 70 años
0-30	8	8	8	6
31-40	12	10	8	6
41-50	14	12	10	8
51-60	16	14	12	10
61-70	18	16	14	12
>70	18	18	16	14

A partir del año 2009 se aconseja tomar como mínimo 8 muestras en próstatas de 30-40 cc añadiendo que más de 12 muestras en la primera biopsia no son más concluyentes, teniendo en cuenta las directrices del estudio ProTECT de obtener 10 cilindros. Básicamente se siguen las directrices de los trabajos de Presti et al <sup>196</sup> y la revisión sistemática de Eichler et al <sup>197</sup>. El primero concluye que la diferencia diagnóstica entre el esquema octante y el de doce muestras es de alrededor del 3%. La revisión sistemática de Eichler concluye que añadir muestras laterales al esquema clásico incrementa un 31% el rendimiento diagnóstico, pero no más de 12 cilindros.

Las muestras para el estudio histopatológico se deben de obtener de la zona periférica, lo mejor en la zona postero lateral, así como en las zonas sospechosas al tacto rectal o en las técnicas de imagen. La biopsia de la zona transicional tiene sentido cuando ha habido biopsias previas negativas y cuando se sospecha en las pruebas de imagen una neoplasia.

Parece evidente revisando toda la literatura que aumentando el número de muestras se aumenta el rendimiento diagnóstico, pero parece que a partir de un determinado número este incremento es poco significativo. Por tanto entran en juego otros factores para aumentar el rendimiento diagnóstico tales como: número de cilindros, localización de las muestras, tamaño prostático, calidad de los cilindros, selección correcta del paciente, y experiencia del urólogo y el patólogo.

Según refiere en su artículo Stephenson et al. <sup>198</sup> la biopsia por saturación se ha defendido, pero puede aumentar el número de complicaciones infecciosas y hemorrágicas, y que por lo general requiere anestesia general. Por lo tanto, el cáncer de próstata es la única neoplasia sólida diagnosticada por biopsia ciega del órgano, es decir, sin la visualización del tumor. Alrededor del 50% de los cánceres detectados por este método puede no ser de importancia clínica. Además, las biopsias sistemáticas son pobres en el muestreo de lesiones en la zona anterior, en la línea media, y el ápex de la próstata. Esto puede conducir a infra diagnosticar lesiones importantes en estas regiones. Además, casi un tercio de los cánceres detectados

actualmente se reclasifican del Gleason de la biopsia original a una puntuación más alta en la anatomía patológica final <sup>199</sup>.

La evolución de las técnicas de imagen por ecografía que ayudan a la toma de muestras en las biopsias de próstata comienza en los 80 cuando muchos autores comienzan a publicar que la ecografía transrectal y la biopsia ecodirigida podían ser un método para incrementar la capacidad diagnóstica de cáncer de próstata, detectando más tumores y de un pronóstico más favorable <sup>200, 201</sup>. En estos años se describieron tasas de sensibilidad entre el 70 y 86% y especificidades mayores del 60% (Figura 1-15)

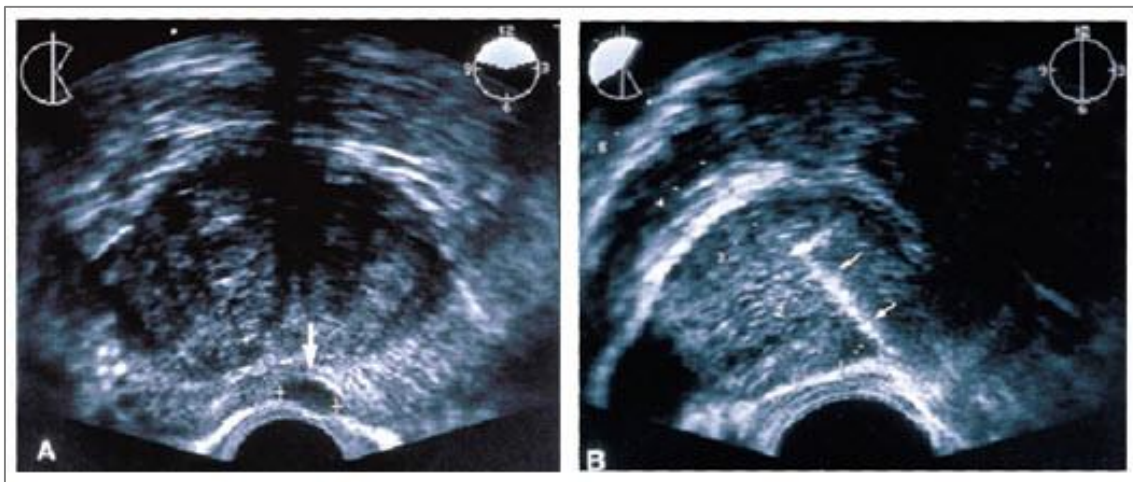


Figura 1-15. Imagen tomada de [www.elsevier.com](http://www.elsevier.com). Imagen de nódulo hipoeoico en corte trasnversal de la prostata (A) y aguja de biopsia (B)

Pero con el paso de los años este auge se desvaneció debido a que en los sucesivos estudios no se halla relación entre la ecografía transrectal y la presencia de cáncer de próstata (Figura 1-16) Esto se debía a que con el descenso en la media del PSA en el momento de biopsiar, en la ecografía transrectal no se hallaban anomalías visibles <sup>202</sup>.

Otro problema que tiene la biopsia de próstata y que Tareen et al <sup>203</sup> refleja en su estudio es que la biopsia subestima en un importante porcentaje la presencia de enfermedad bilateral. Según estos autores de todos los pacientes que en la biopsia se decía que tenían enfermedad unilateral, cuando fueron sometidos a prostatectomía radical solo el 27,6% tenían realmente enfermedad unilateral en la pieza final.

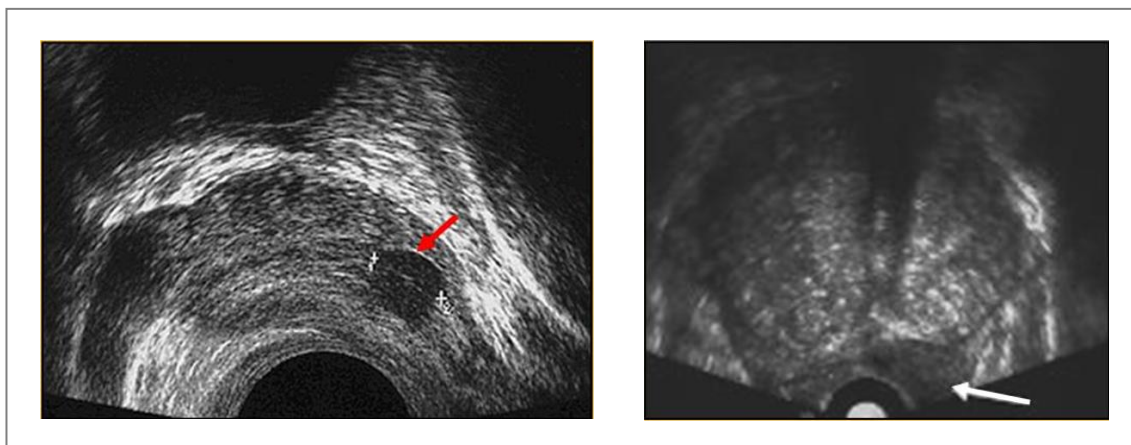


Figura 1-16. Imagen tomada de [www.elsevier.es](http://www.elsevier.es). Imagen de ecotransrectal con nódulo hipoecoico sospechoso.

Por estos motivos en los últimos años tal y como he comenzado explicando antes estamos viviendo un auge en las técnicas de imagen combinadas con estudios metabólicos o no que intentan responder a varias cuestiones. Han de ser capaces de minimizar el número de muestras dirigiendo la biopsia hacia lesiones sospechosas, han de poder caracterizar los tumores unilaterales con fiabilidad para posibles terapias focales e identificar los tumores poco significativos clínicamente de los más agresivos para ser capaces de dirigir y personalizar el tratamiento más adecuado en cada caso.

## 1.7.2 NUEVAS TÉCNICAS DE IMAGEN

Habitualmente las lesiones sospechosas suelen ser hipoecoicas, pero un 30% pueden ser isoecoicas y un pequeño porcentaje hiperecoicas. En este aspecto se han realizado avances en esta técnica que van desde el empleo de técnicas doppler, la elastografía y la eco asistida por ordenador con técnicas como C-TRUS/ANNA o el Histoscanning.

### 1.7.2.1 Elastografía

La elastografía mide la disminución de la elasticidad tisular. Los tejidos que tienen una mayor densidad permiten menor desplazamiento durante la compresión de los tejidos blandos (Figura 1-17) Las señal durante la compresión y descompresión

genera un diagrama que se traduce en un mapa de color de la densidad tisular <sup>204, 205</sup>. Uno de los problemas que tiene esta técnica es la variabilidad interobservador en cómo se adquieren los datos y su interpretación. Por ello se definió el índice de tensión (IT) como una medida cuantitativa que compara el valor de tensión de la lesión sospechosa con la del tejido circundante. Algunos autores muestran que este índice ha ayudado a discriminar tejido maligno de benigno <sup>206</sup>.

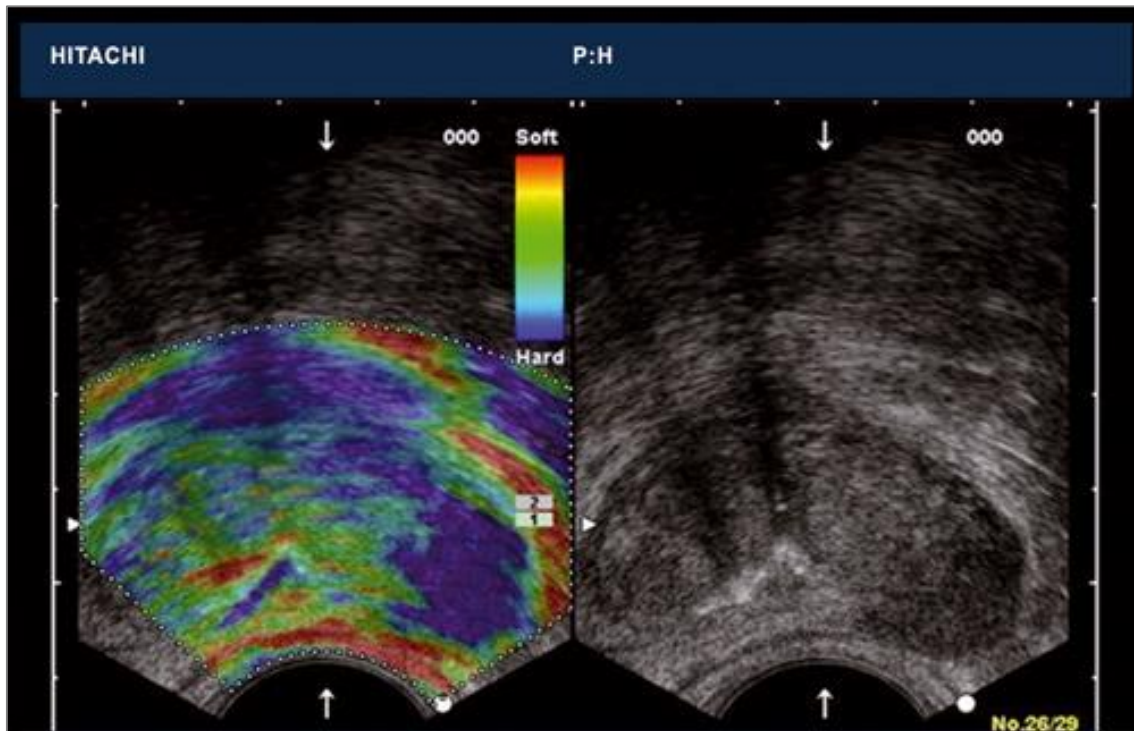


Figura 1-17. <http://www.hitachi-medical-systems.es/productos-y-servicios/ultrasonidos/aplicaciones-clinicas/aplicaciones-clinicas-hitachi/urologia.html>. Se observa mapa de color de las diferentes densidades tisulares de la próstata.

Otros autores como Zhan et al <sup>207</sup> describen sensibilidades, especificidades y exactitud cercanas al 85% si se añadía a la biopsia convencional el potencial diagnóstico de la elastografía en tiempo real (ELRT)

A pesar de que parece una técnica con futuro aun precisa de ensayos aleatorizados y de momento no sustituye a la biopsia de próstata sistematizada.

### 1.7.2.2 Ecografía transrectal asistida por ordenador: histoscanning y c-trus/anna

El Histoscanning es una tecnología que detecta cambios en la morfología de los tejidos extrayendo y cuantificando las características estadísticas de los datos ecográficos reflejados (Figura 1-18 y Figura 1-19) Capta los cambios físicos en las ondas sónicas como consecuencia de la interacción de los tejidos tumorales con los ultrasonidos. Existen estudios como el de Simmons et al <sup>208</sup> con resultados prometedores pero con limitaciones claras en su diseño.

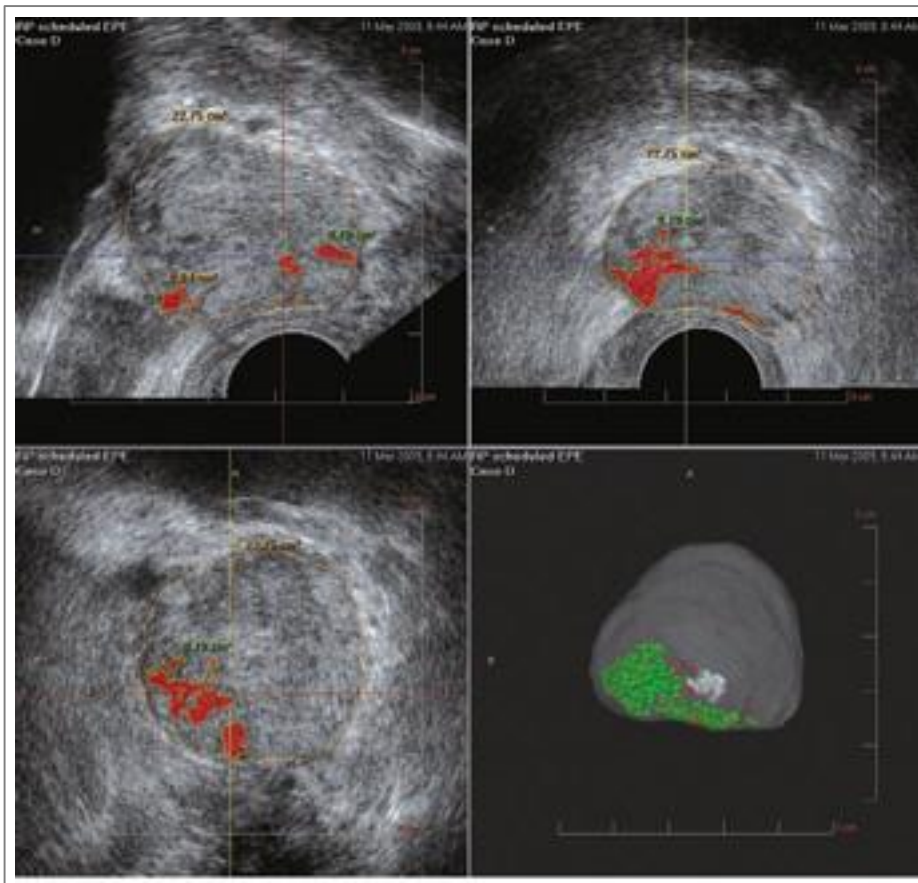


Figura 1-18. Prostate Hydroscanning™- Áreas sospechosas de tumor y reconstrucción con histoscanning posterior.

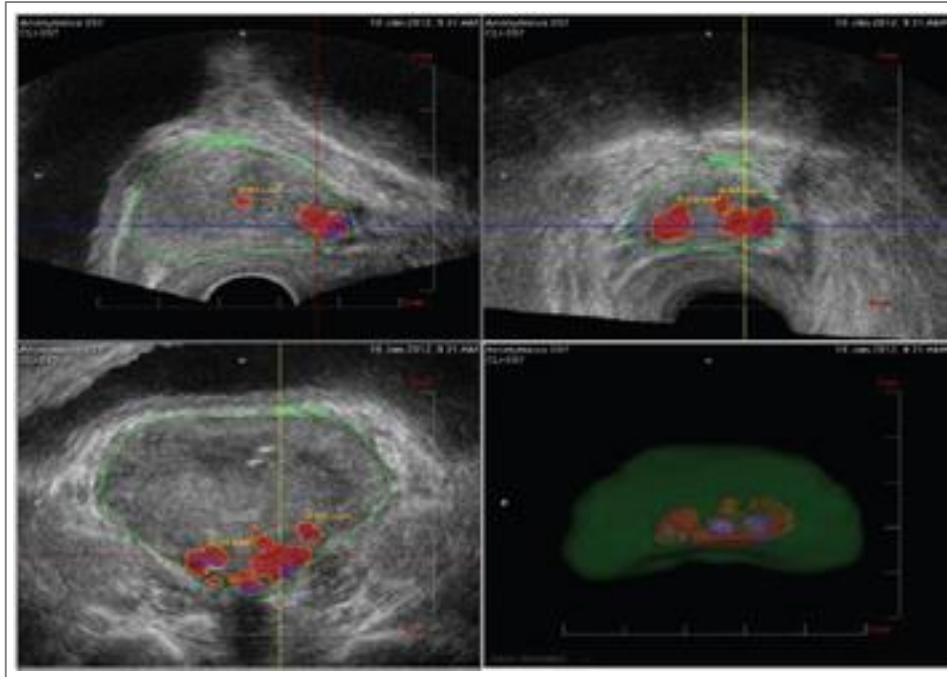


Figura 1-19. Visualización 3D de áreas sospechosas en rojo o morado. <http://new.histoscanning.webfactional.com/prostate-histoscanningtm-tt/the-technology/>

## C-TRUS/ANNA

Consiste en un análisis por ordenador de la imagen basado en la correlación previa de los hallazgos ecográficos con los histológicos de piezas de prostatectomía mediante una red neuronal artificial (*Artificial Neural Network Analysis*) Con esto según Loch et al <sup>209</sup> se detectó cáncer de próstata en el 50% de pacientes con dos series de biopsia previa negativa.

### 1.7.2.3 Resonancia magnética

Son muchos los estudios que consideran a la RMN la técnica de imagen no invasiva más sensible para la estadificación local del tumor, permitiendo valorar también la afectación ganglionar y la posibilidad de metástasis óseas. Se ha convertido en una herramienta muy útil en la valoración preoperatoria del paciente.

Como técnica de imagen tiene una resolución alta para diferenciar tejidos blandos, junto con el uso de la antena endorrectal combinada con antena externa de 1,5-3

Tesla (T), aumenta significativamente el contraste del tejido prostático y la delimitación de la capsula.

La RMN aporta información muy rentable en cuanto a la valoración de la integridad de la capsula, el ápex, el estado de los haces neurovasculares y la indemnidad de las vesículas seminales<sup>198</sup>.

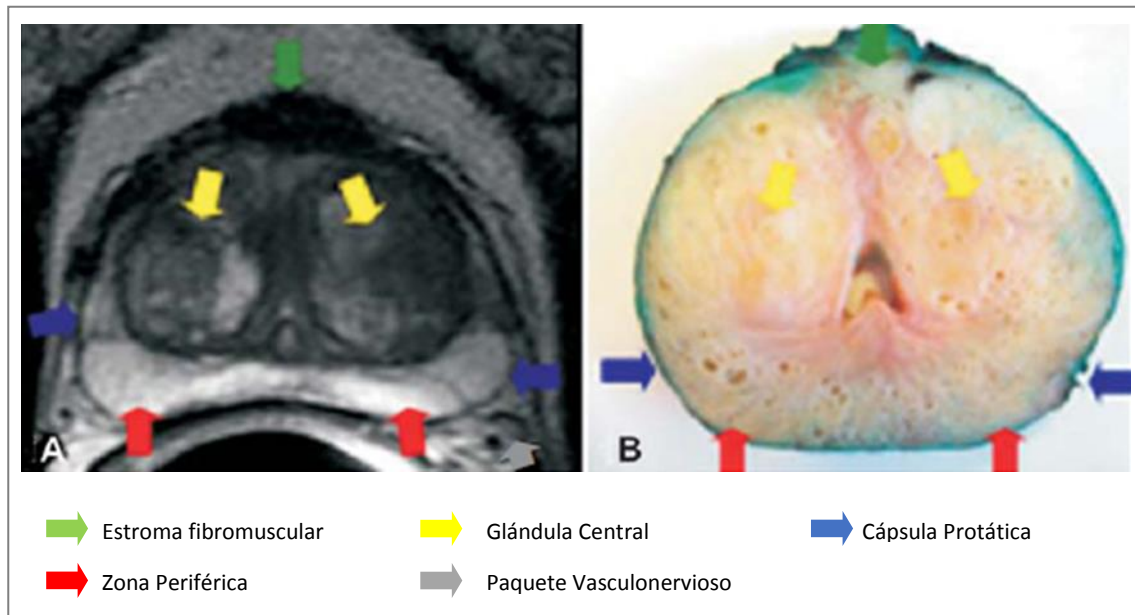


Figura 1-20. Correlación entre imagen de RM ponderada en T2 (A) e imagen macroscópica de la pieza de la cirugía. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-39842009000300012>

Con la RMN se pueden obtener imágenes en T1 y T2. Las secuencias en T1 permiten identificar hemorragias post-BP así como evaluar la presencia de adenopatías o afectación ósea, pero no permite una correcta evaluación del parénquima prostático que se valora en T2 donde los nódulos tumorales de la periferia presentan una señal uniforme de baja intensidad (Figura 1-20)

A pesar de esto existen numerosos falsos positivos ocasionados por hemorragia, inflamación, secuelas de tratamiento hormonal o radioterapia. Estos factores han limitado la capacidad diagnóstica de la RMN. Algunos autores refieren en sus estudios tasas de sensibilidad y especificidad comparadas con el resultado anatomopatológico

de la pieza de prostatectomía en T2 del 52-83% y 46-88% respectivamente con 1,5 teslas, no mejorando significativamente con 3 teslas <sup>210</sup>.

Por ello en los últimos años los avances han ido encaminados en la búsqueda de técnicas complementarias que incrementen la capacidad de diagnosticar y estadificar correctamente la patología. Estos avances vienen por la combinación de estudios morfológicos y funcionales que incluyen RMN dinámica potenciada por contraste, RMN de difusión y espectroscopia combinadas en lo que se llama RMN multiparamétrica<sup>211</sup>. La asociación europea de radiología urogenital recomienda igualmente el uso de la RMN multiparamétrica para incrementar la sensibilidad en la detección de tumores <sup>212</sup>.

La RMN de difusión consiste en tomar secuencias en T1 a medida que el gadolinio pasa a través de la próstata, cuyo tiempo varía en función de la angiogénesis tumoral. Los parámetros de la imagen dinámica se estiman como el tiempo hasta el realce, el pico del realce y el tiempo de lavado<sup>212</sup>. Según los trabajos publicados un pico alto de realce y un realce temprano son los predictores más fiables del cáncer de próstata en la periferia, mientras que el lavado rápido y una alta permeabilidad de los vasos sanguíneos son más sensibles para el cáncer de próstata de la zona transicional (Figura 1-21)

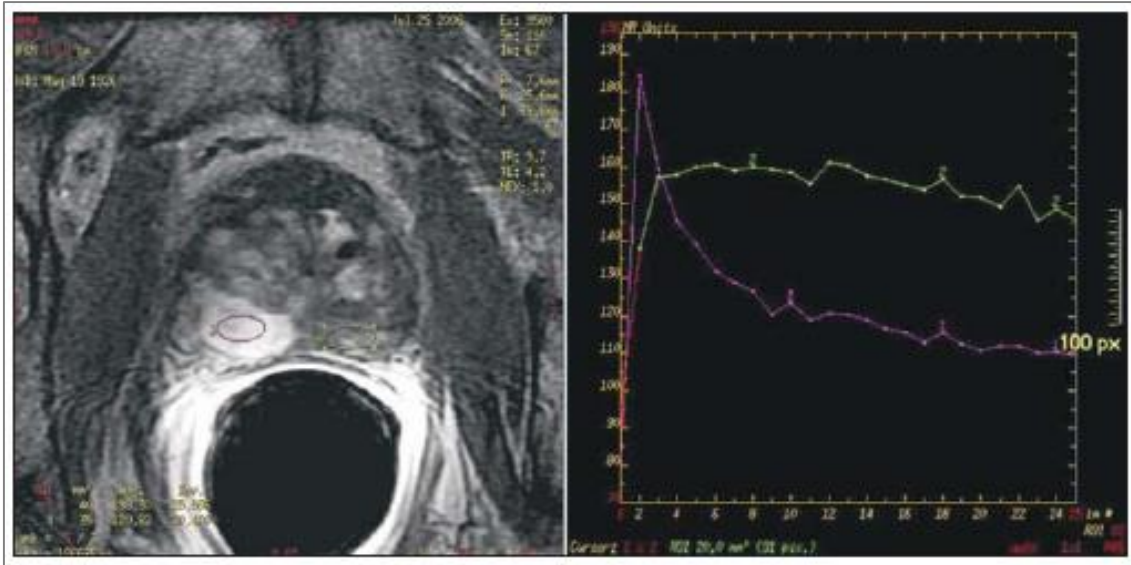


Figura 1-21. Imagen de RM ponderada en T1 no plano axial, después de la inyección de contraste paramagnético, demostrando lesión con realce precoz en la zona periférica derecha. Gráfico perfusional: pico de realce precoz seguido de “wash-out” en el área tumoral (línea rosa) y realce progresivo y persistente en la zona periférica normal a la izquierda (línea verde) <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-39842009000300012>

Por otro lado la espectroscopia por RMN añade información metabólica que incluye los niveles de citrato, creatinina y colina dentro de la próstata. El cáncer de próstata muestra altos niveles de colina y bajos de citrato en comparación con la zona periférica normal (Figura 1-22) Esto es así porque la colina es fundamental para la actividad de recambio de membrana típica de procesos proliferativos como el cáncer. Esta se caracteriza por voxels con un ratio  $(\text{colina} + \text{creatinina})/\text{citrato} < 0,75$ <sup>213</sup>. Tiene una alta especificidad pero una baja sensibilidad por lo que la adición de la técnica en 3D ayuda al diagnóstico.

La espectroscopia ayuda también a la discriminación de los cánceres de próstata poco significativos o no significativos según publican varios autores<sup>214</sup>.

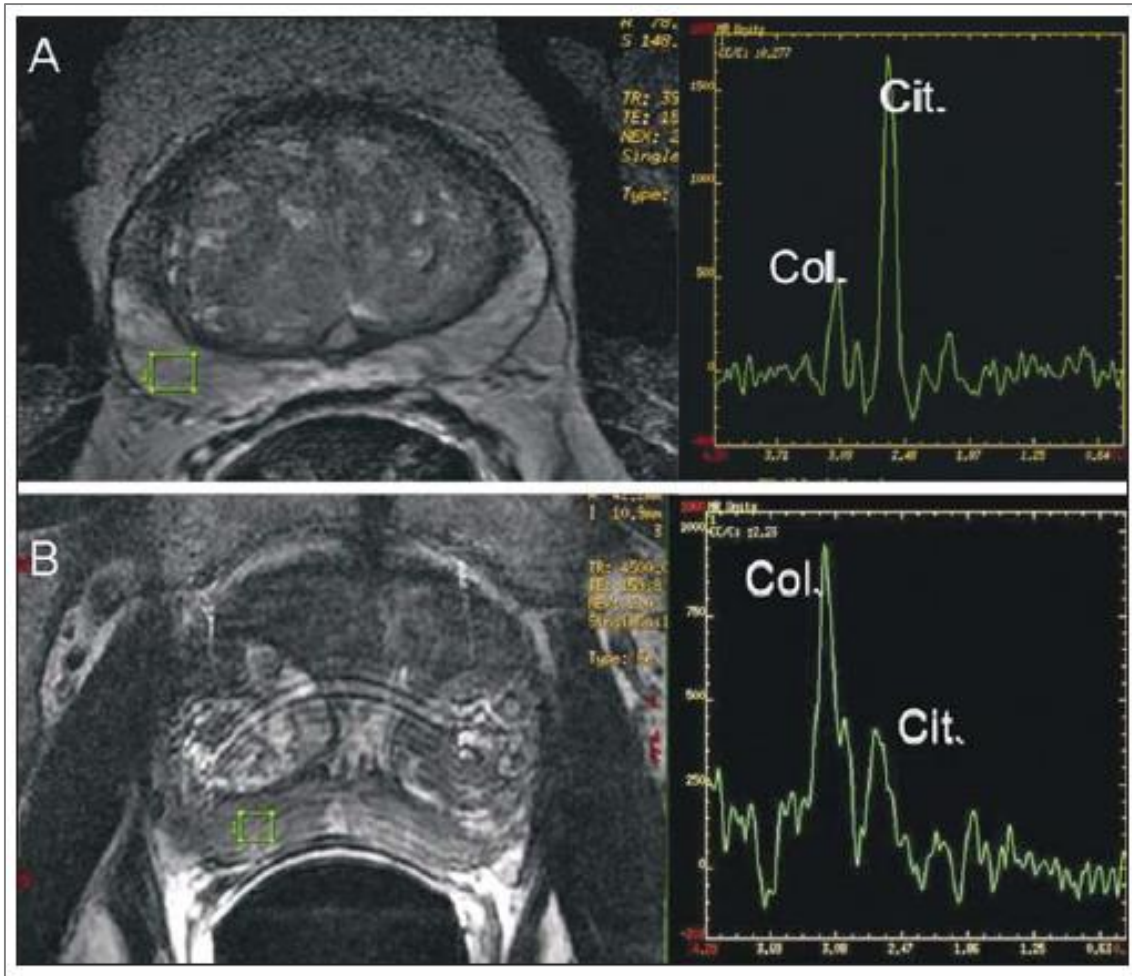


Figura 1-22. A: Zona periférica normal, con alta señal en imagen de RM ponderada en T2, y con gráfico espectral demostrando colina baja y citrato alto. B: CaP en zona periférica, con baja señal en imagen de RM ponderada en T2, y con gráfico espectral demostrando colina alta y citrato bajo. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-39842009000300012>

Con respecto a la RMN por difusión cabe destacar que puede asociarse a una mejor determinación de la agresividad tumoral. Esta técnica mide la anisotropía fraccional de las moléculas de agua dentro de la próstata y que se expresa en el mapa del Coeficiente de Difusión Aparente. El tejido con tumor tiene un movimiento de agua más limitado debido a la mayor densidad celular y la abundancia de membranas intra e intercelulares produciendo por lo tanto según afirman varios autores CDAs más bajos <sup>215</sup>.

Teniendo en cuenta todos estos datos se ha encontrado una relación inversa entre los valores del coeficiente de difusión aparente y el grado de Gleason en la pieza

quirúrgica. Por tanto a mayor CDAs menor grado tumoral. Esta relación se mantiene al clasificar los tumores por grupos de riesgo de D'Amico.

Con todos estos avances en el campo de las técnicas de imagen la RMN multiparamétrica cobra un papel fundamental en la valoración pre biopsia de los pacientes. Son numerosos artículos los que avalan el uso de esta técnica como técnica pre-biopsia así como técnica útil después de una primera biopsia negativa.

Con respecto a la utilidad tras una biopsia previa sin tumor, algunos autores como Laurentschuck et al <sup>216</sup> detectaron tasas de sensibilidad, especificidad y exactitud de 57-100%, 44-96% y 67-85% respectivamente. Otros autores <sup>217</sup> exponen que con la RMN multiparamétrica se detectan un 59% de cáncer de próstata con una mediana de cilindros obtenidos mayor que en la población comparada de pacientes en los que se realizó re-biopsia no dirigida por RMN.

Con estos resultados bastante alentadores en la re-biopsia, se comenzó a investigar su papel en pacientes sin biopsia previa, es decir, en aquellos con sospecha de cáncer de próstata por elevación del PSA o tacto rectal sospechoso. Se planteó que igual sería posible disminuir el número de pacientes sometidos a biopsia de próstata, mejorando el rendimiento de la biopsia y evitando la interferencia de la hemorragia post-biopsia en la interpretación de las imágenes.

En un estudio de Park BK et al <sup>218</sup> en el que se aleatorizó la realización de RMN pre biopsia con toma de muestras de áreas sospechosas o biopsia sistematizada sin RMN previa, se hallaron diferencias significativas a favor del grupo con RMN previa (OR para detección de cáncer de próstata y tasa de cilindros positivos 3,9 (95% IC: 1,1-13,1) y 4,2(95% IC: 2,2-8,1 respectivamente)

Otros autores como Haffner et al <sup>219</sup> tras un estudio en el que se analizan 555 pacientes a los que se le realiza RMN multiparamétrica concluyen que la RMN hubiera necesitado únicamente una media de 3,8 muestras en el 63% de los

pacientes con hallazgos positivos evitando el diagnóstico de un 13% de cáncer de próstata no significativo, aunque hubiera perdido 13 de ellos.

Por último algunos autores plantean que deberíamos de usar la RMN multiparamétrica previa a la biopsia puesto que una RMN negativa arroja los mismos niveles de seguridad que dos sets de biopsia sin malignidad. Si el VPN supera el 95% para cáncer significativo reduciría de forma significativa el número de biopsias innecesarias, mejorando el nivel de información previa en aquellos que fueran diagnosticados <sup>220, 221</sup>.

Tras todos los avances en las técnicas de imagen el reto se plantea en estos momentos en la fusión de imágenes. Es algo complejo técnicamente debido a los dispositivos y agujas especiales que requiere la RMN, la posición del paciente, la deformidad de la próstata por el transductor endorrectal o los movimientos del paciente. A pesar de esto algunos autores afirman que la fusión de imágenes con la biopsia es viable, con una tasa de detección de cáncer de próstata superior a la biopsia sistematizada <sup>222</sup>. Según el artículo de Stephenson et al <sup>198</sup> sobre los avances en las técnicas de fusión de RMN para diagnóstico de cáncer de próstata en los últimos 5 años, las biopsias dirigidas a través de fusión de imágenes (RMN-ecografía transrectal) detectan más sensiblemente tumores, diagnosticando más tumores significativos y menos insignificantes. Refiere que la RMN no debe ser utilizada como un método para aplazar la biopsia ya que no se conocen los falsos negativos, y que los grupos que más se benefician de esta técnica son los varones con lesiones de bajo riesgo en la vigilancia activa y los pacientes con niveles elevados de PSA y biopsias convencionales negativas anteriores.

Por tanto las nuevas tecnologías de imagen son un pilar básico en la contribución al diagnóstico y tratamiento del cáncer de próstata, para lograr tomar decisiones individualizadas y aplicar el tratamiento más adecuado.

## 1.8 HISTOPATOLOGÍA

Consiste en el análisis anatomopatológico de los cilindros obtenidos en la biopsia. Se remiten en frascos separados y se procesan de forma independiente para cada lado de la próstata al menos. No deben incluirse más de 3 cilindros por bote y deben de cortarse el bloque a tres alturas para optimizar la detección de las lesiones pequeñas.

Las técnicas de inmunohistoquímica con citoqueratinas de alto peso molecular (34 beta E12) y p63 son de mucha utilidad para corroborar la ausencia de capa basal en los focos sospechosos y confirmar un mínimo foco de adenocarcinoma o apoyar en caso contrario la benignidad del proceso <sup>223</sup>. Sin embargo se sabe que la negatividad de inmunotinción para células basales en glándulas sospechosas no necesariamente indican malignidad y algunos patrones de glándulas benignas pueden morfológicamente aparentar neoplasia, habiéndose descrito que glándulas benignas incluso pueden disponerse alrededor de filetes nerviosos imitando una invasión perineural<sup>224</sup>.

En el estudio morfológico de la biopsia prostática es recomendable seguir unas pautas y enmarcar el diagnóstico de la biopsia en una de las siguientes categorías diagnósticas: adenocarcinoma, proliferación acinar pequeña y atípica (ASAP), neoplasia intraepitelial de alto grado (HGPIIN), inflamación o tejido prostático benigno<sup>225</sup>. Estas se citan en las guías europeas de urología con los términos que se describen en el artículo de Van der Kwast <sup>226</sup> (Tabla 1-3)

Tabla 1-3. De Van der Kwast et al. 2013 (226); PIN = Neoplasia Intraepitelial prostática.

<b>Benigno / negativo para malignidad. Si es apropiado, incluir una descripción.</b>
<b>Inflamación activa, negativa por malignidad</b>
<b>Atípic adenomatosa hiperplasia / adenosis, sin evidencias de malignidad</b>
<b>Inflamación granulomatosa, negativa por malignidad</b>
<b>PIN de alto grado, negativo por adenocarcinoma</b>
<b>PIN de alto grado con glándulas atípicas, sospecha de adenocarcinoma</b>
<b>Foco en glándulas atípicas / lesión sospechosa para adenocarcinoma / proliferación acinar atípica pequeña, sospecha de cáncer</b>
<b>Adenocarcinoma</b>

Comenzamos por las lesiones precursoras de cáncer de próstata.

### 1.8.1 PIN DE ALTO GRADO

Es una lesión precursora de cáncer prostático que se define como un cambio proliferativo anormal en los conductos prostáticos normales (Figura 1-23) Obtener PIN de alto grado en la biopsia prostática es poco frecuente oscilando alrededor del 5% <sup>227</sup>, en tanto que el riesgo de cáncer en la 1ª biopsia consecutiva está estimado entre el 23-35% <sup>228</sup>. El hallazgo de extensas áreas de PIN de alto grado no se correlaciona con un aumento en concentraciones séricas de PSA total ni libre <sup>229, 230</sup>. Esto se explicaría por la integridad de las glándulas afectadas por PIN, en contraposición con la ausencia de capa basal en las acinis neoplásicos en los que la célula secretora atípica contacta directamente con el estroma circundante. Se ha observado recientemente que el riesgo de cáncer prostático, tras un diagnóstico patológico de HGPIIN en la biopsia, está relacionado con el número de cilindros practicados en la biopsia de seguimiento. Así el valor predictivo del PIN de alto grado ha disminuido, de una tasa de recurrencia media antes del año 2000 de 36% a una tasa del 21% en estudios posteriores <sup>231</sup>.

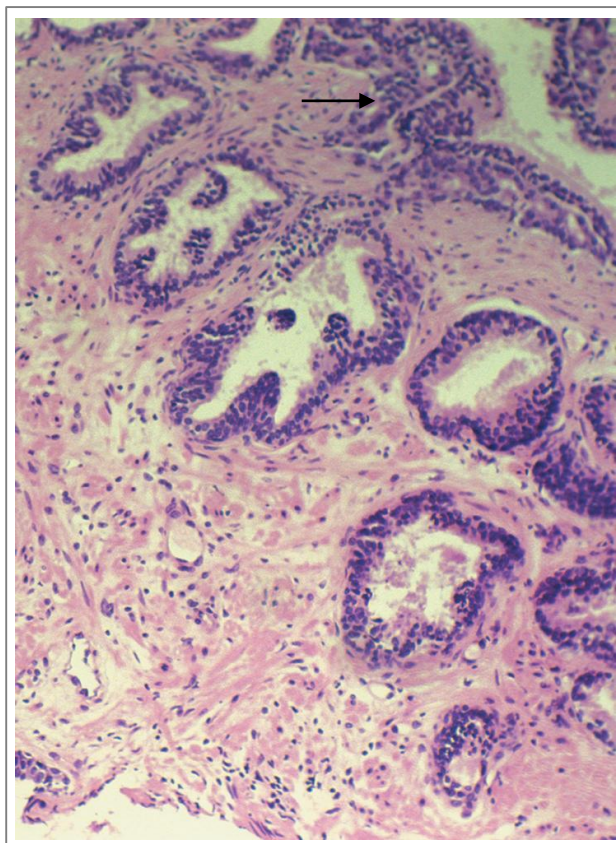


Figura 1-23. *www.elsevier.es*. Áreas de PIN de alto grado (Flecha)

Obtener un foco de PIN de alto grado aislado en la biopsia no tiene indicación de repetir la biopsia. Se ha de rebiopsiar en base a los hallazgos clínicos tal y como se indican en las guías clínicas europeas<sup>232, 233</sup>.

Las áreas HGPIN expresan AMACR (α-Methylacyl-Coa-Racemasa) con una intensidad similar al carcinoma, pero estudios semicuantitativos han demostrado menor intensidad significativa en aquellas áreas de PIN respecto a las áreas de carcinoma invasivo<sup>234</sup>.

La hiperplasia adenomatosa atípica (HAA), considerada por algunos la lesión precursora del adenocarcinoma de zona transicional, puede representar un problema diagnóstico en la biopsia prostática extensiva que incluya dicha zona. La tinción de inmunohistoquímica para p504S/AMACR ayuda en la mayoría de los casos de hiperplasia adenomatosa atípica, pero no en todos, a diferenciarla del adenocarcinoma.

### 1.8.2 PROLIFERACIÓN ACINAR ATÍPICA (ASAP)

La morfología de “pequeña proliferación acinar atípica” conocida como ASAP (Atypical Small Acinar Proliferation) se observa en el 3-5% de las biopsias <sup>235</sup>. Esta proliferación acinar atípica no es en sí una entidad patológica, sino una categoría diagnóstica o expresado de otro modo un conjunto de hallazgos morfológicos en la biopsia que no permiten al patólogo establecer con claridad de qué tipo de lesión se trata (Figura 1-24) El valor predictivo de ASAP según las series oscila entre un 40% y 50%. El riesgo de cáncer en la segunda biopsia, con un diagnóstico previo de ASAP, oscila en el 50% representando el resto lesiones reactivas, con mayor frecuencia acinis atróficos <sup>236</sup>. La incidencia de ASAP ha disminuido en los últimos años tras la introducción del marcador AMACR en el estudio rutinario de la biopsia de próstata. En un estudio reciente comparan el valor predictivo de ASAP en los años 1997-2000 respecto a los años 2000-2005, se ha observado un descenso de su valor predictivo desde 45% en el primer grupo al 37% en el segundo grupo <sup>237</sup>. Este cambio en el valor predictivo puede atribuirse al estudio de más cilindros en la biopsia extensiva utilizada actualmente y a la introducción del anticuerpo para inmunohistoquímica de la a-Methylacyl-Coa-Racemasa, muy resolutiva en un alto porcentaje de casos.

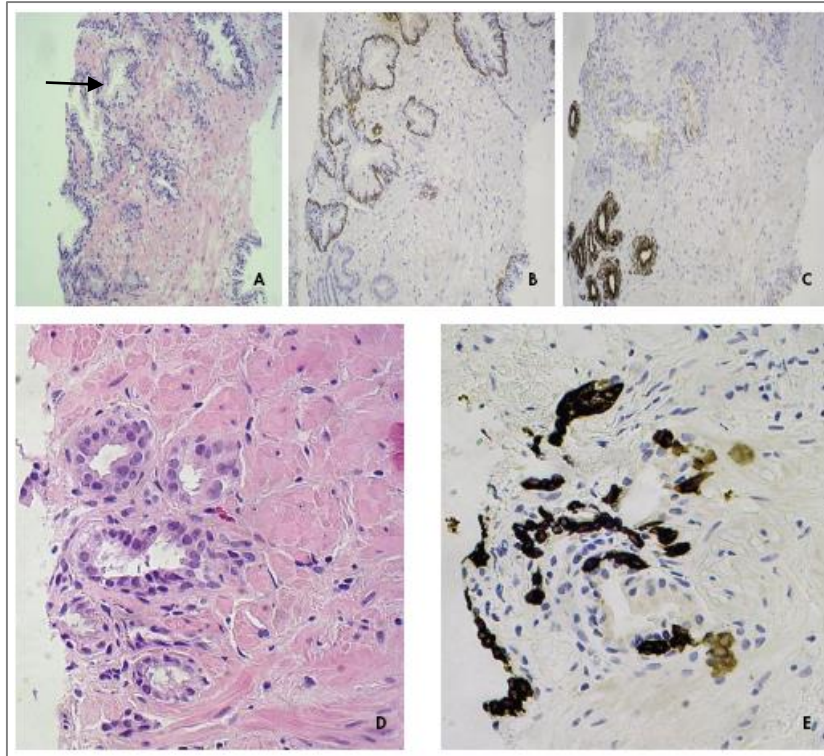


Figura 1-24. (A) Cilindro prostático con sesión de A.S.A.P. mostrando inmunoreacción negativa para citoqueratina basal (B) e intensa inmunoreacción para AMACR (C) Confirmando así el diagnóstico de mínimo foco de adenocarcinoma (X100H&E; X100IH) (D) Lesión de A.S.A.P. (X250 H&E) con expresión inmunohistoquímica para citoqueratina basal y diagnóstico de 'grupo acinar atrófico distorsionado' € (X250IH) . Inés de. Últimos avances anatomopatológicos en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata. Arch. Esp. Urol. [online]. 2006, vol.59, n.10 [citado 2015-05-16], pp. 1089-1110 . Disponible en: <<http://scielo.isciii.es/scielo.php>

### 1.8.3 ATROFIA PROLIFERATIVA INFLAMATORIA (P.I.A)

El papel de la inflamación crónica en la carcinogénesis prostática está siendo replanteado de nuevo, al demostrarse recientemente alteraciones somáticas de los genes implicados en las defensas frente al daño inflamatorio, durante el ciclo de lesión y reparación tisular <sup>238</sup>. La presencia de acinis con atrofia del epitelio en próstata periférica ha sido una morfología clásicamente reconocida por los patólogos (Figura 1-25) Dado que este tipo de atrofia usualmente se asocia a inflamación crónica y aguda, y en base a los trabajos de Marzo <sup>239</sup> se definió la lesión de "atrofia proliferativa inflamatoria" o PIA considerándola una nueva lesión precursora en el desarrollo del cáncer prostático y/o PIN de alto grado. En la morfología de PIA, las células de tapizamiento de la atrofia acinar muestran un peculiar aspecto proliferativo con aumento del tamaño nuclear y presencia de nucléolo en el contexto

de una intensa inflamación periacinar y estromal. Se ha propuesto, siguiendo el esquema de Rushka<sup>240</sup>, una clasificación histológica de las lesiones de PIA en los siguientes tipos: atrofia simple, hiperplasia post-atr6fica y patr6n mixto (atrofia simple/hiperplasia post-atr6fica)

Los principales cambios moleculares descritos en las lesiones de PIA que justificarían la hipótesis de posible lesión precursora del adenocarcinoma prostático serían la expresión aumentada para Ki-67 (marcador de replicación celular) y Bcl-2, (pudiendo contribuir a una mayor resistencia a la apoptosis), la menor expresión de p27 (al igual que en PIN de alto grado y el CaP) la sobreexpresión para K5 y c-MET; y expresión laxa de K14, la negatividad para p63 en el compartimiento luminal epitelial de la lesión de PIA, con fenotipo de “célula intermedia” entre la células basal y secretora, las anormalidades a nivel del cromosoma 8 detectadas por FISH, el incremento en las mutaciones de p53, p16 y del receptor de andrógenos, y por último el incremento en la frecuencia de metilación de islas GpC del gen GSTP1 <sup>234</sup>. En la actualidad hay gran controversia en el significado clínico de las lesiones de PIA ya que algunos autores no han observado su relación con HGPIN <sup>241</sup> y no todos los PIN de alto grado o carcinomas de zona periférica se asocian a áreas de atrofia proliferativa inflamatoria. En definitiva, los focos de PIA en próstata periférica podrían ser consecuencia de una respuesta proliferativa asociada a la edad y a estímulos microambientales que provocarían alteraciones genómicas, originando así focos de neoplasia intraepitelial de alto y finalmente adenocarcinoma.

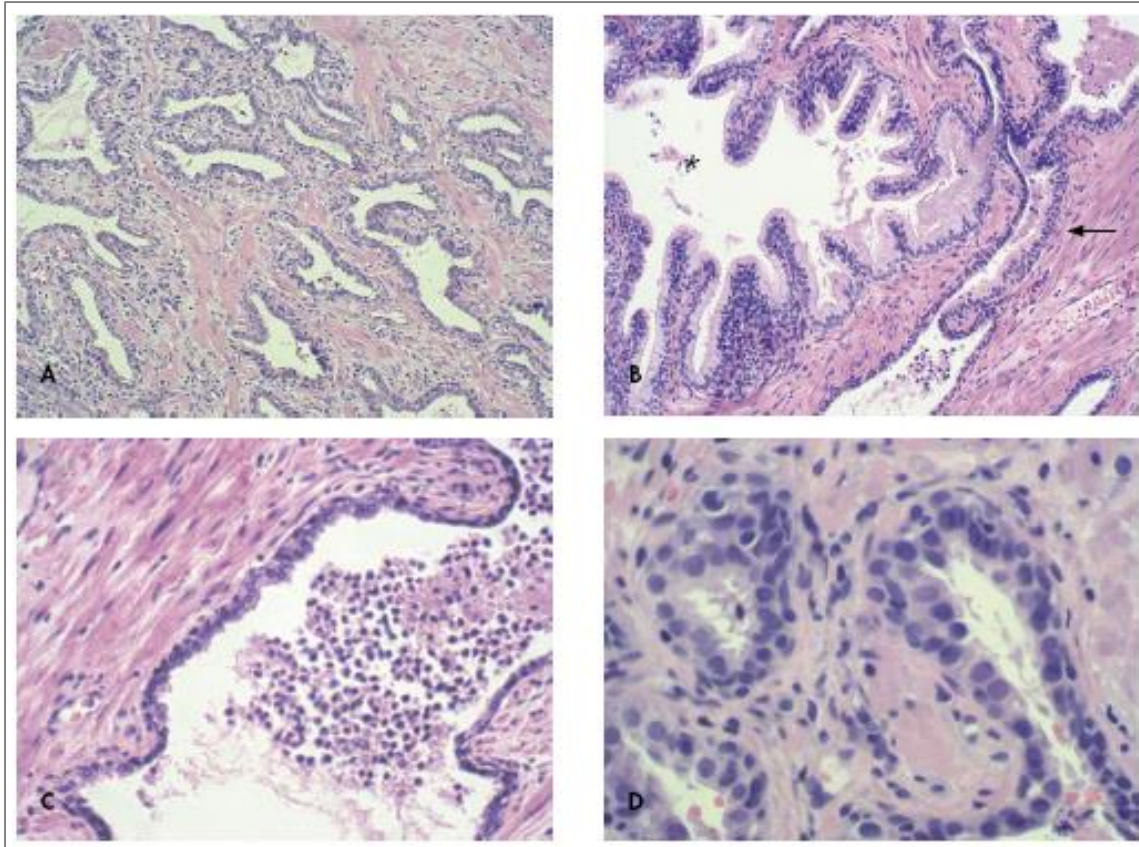


Figura 1-25. (A) Atrofia proliferativa inflamatoria en zona periférica de pieza de prostatectomía (X100H&E) (B) Foco de HGPIN (\*) en continuidad con lesión de PIA (flecha) (X100H&E); (C) Atrofia glandular con epitelio basal prominente y epitelio secretor atrófico con inflamación intraluminal (X250H&E) (D) PIA con hiper cromasia nuclear, ocasionales meganucleólos e intensa inflamación estromal periglandular con exocitosis epitelial (X250H&E) Inés de. Últimos avances anatomopatológicos en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata. Arch. Esp. Urol. [online]. 2006, vol.59, n.10, pp. 1089-1110. Disponible en: <<http://scielo.isciii.es/scielo.php>

#### 1.8.4 ADENOCARCINOMA

El adenocarcinoma es una lesión multifocal. Su diagnóstico se basa en una combinación de hallazgos arquitecturales y citológicos. La mayoría de adenocarcinomas se diagnostican con la tinción de hematoxilina-eosina (H&E) y únicamente cuando existe un pequeño foco sospechoso será de utilidad practicar técnicas de inmunohistoquímica. Las células malignas muestran nucléolo eosinófilo prominente y ausencia de células basales en los acinos<sup>234</sup>.

La mayoría de adenocarcinomas prostáticos (más del 90%) que se diagnostican en la biopsia son de tipo acinar o convencional. Se han descrito recientemente variaciones morfológicas de adenocarcinoma acinar que si bien no son tipos histológicos (no

tienen implicaciones clínicas ni pronósticas) sí permiten al patólogo su reconocimiento como adenocarcinoma convencional: atrófico, pseudohiperplásico, de células espumosas ('foamy cell') con células de Paneth, glomeruloide, hipernefroide... Esta morfología en el diagnóstico histopatológico ha de ser informada en términos meramente descriptivos. Existen otros tipos histológicos distintos al adenocarcinoma convencional <sup>246</sup> que pueden ser identificados en la biopsia: ductal, mucinoso, en anillo de sello, carcinoma de células pequeñas, carcinoma sarcomatoide.

### **GRADACIÓN HISTOLOGICA**

El *Sistema de Gleason* (basado en estudios prospectivos de 4000 pacientes entre 1960 y 1973), es el método estándar de graduación del cáncer de próstata en todo el mundo (Figura 1-26)

Se fue imponiendo durante la década de los 80 y en 1993 fue recomendado por la conferencia de Consenso sobre carcinoma de próstata de la OMS. Hoy es el sistema de graduación más utilizado en todo el mundo. El sistema de Gleason se basa únicamente en el grado de diferenciación arquitectural. Se asigna: un patrón primario para el grado dominante y un patrón secundario para el grado no-dominante. El "Score" se obtiene sumando estos dos patrones. El patrón secundario debe comprender al menos un 5% del tumor. Cuando no existe patrón secundario, el Score se obtiene doblando el del patrón primario. El éxito del Gleason se debe a varios factores; se basa únicamente en el grado de diferenciación acinar, no tiene en consideración criterios morfogenéticos ni histogenéticos, tiene en cuenta la heterogeneidad al identificar distintos tipos de patrones y se representa en un dibujo simplificado y muy familiar para los patólogos <sup>234</sup>.

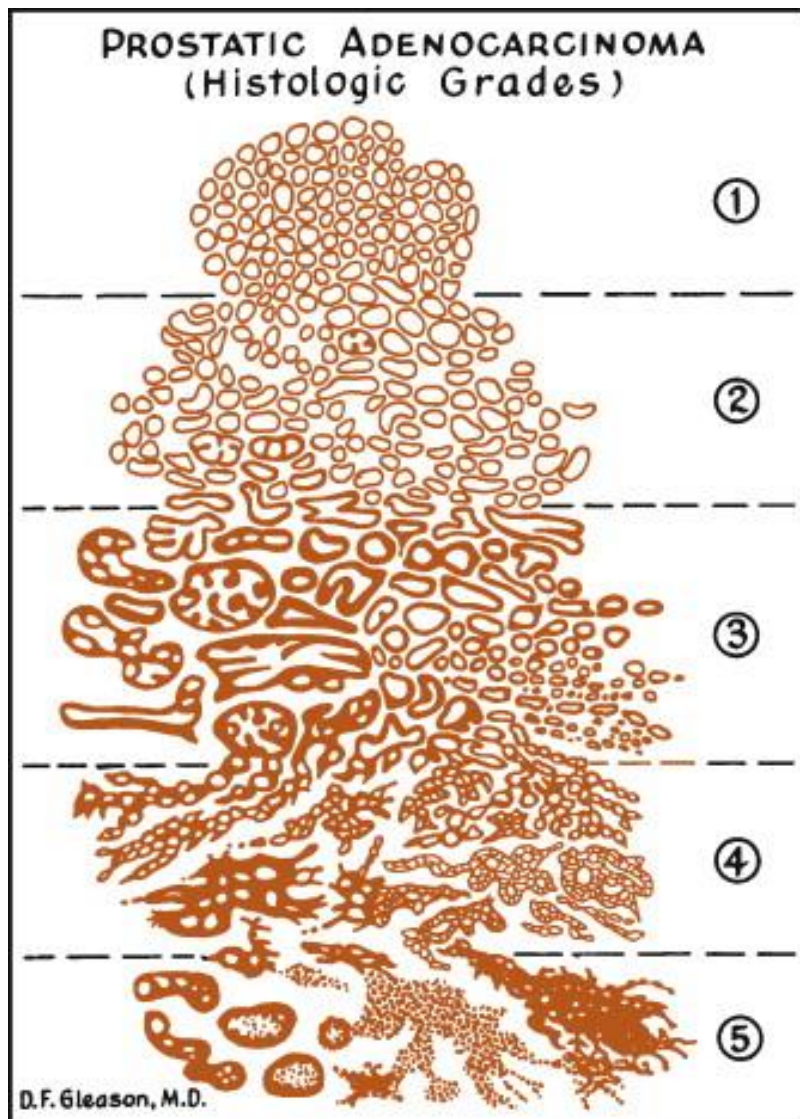


Figura 1-26. Gradación histopatológica de Gleason, 5 patrones. Gleason D, In *Urologic Pathology: The Prostate*. Edited by Tannenbaum M. Philadelphia: Lea & Febiger; 1997 171-198

Se clasifica en 5 grados (Figura 1-27):

**Grado 1.** Micro glándulas uniformes de distribución compacta con buena delimitación tumoral. Es poco frecuente. Suele diagnosticarse en la zona de transición. No se debe diagnosticar en biopsias, nódulo circunscrito o micro acinos redondeados.

**Grado 2.** Glándulas algo irregulares, más separadas y con peor delimitación tumoral. Más estroma entre las células.

**Grado 3.** Mayor variación en el tamaño de las glándulas con mala delimitación tumoral, admitiendo patrones de crecimiento papilar y cribiforme.

**Grado 4.** Glándulas fusionadas en masas de contornos infiltrantes. Hay una variante de células claras o de patrón hipernefroide.

**Grado 5.** Forma poco diferenciada con poca o nula tendencia a formar glándulas (patrón sólido), a veces organizando masas con necrosis central.

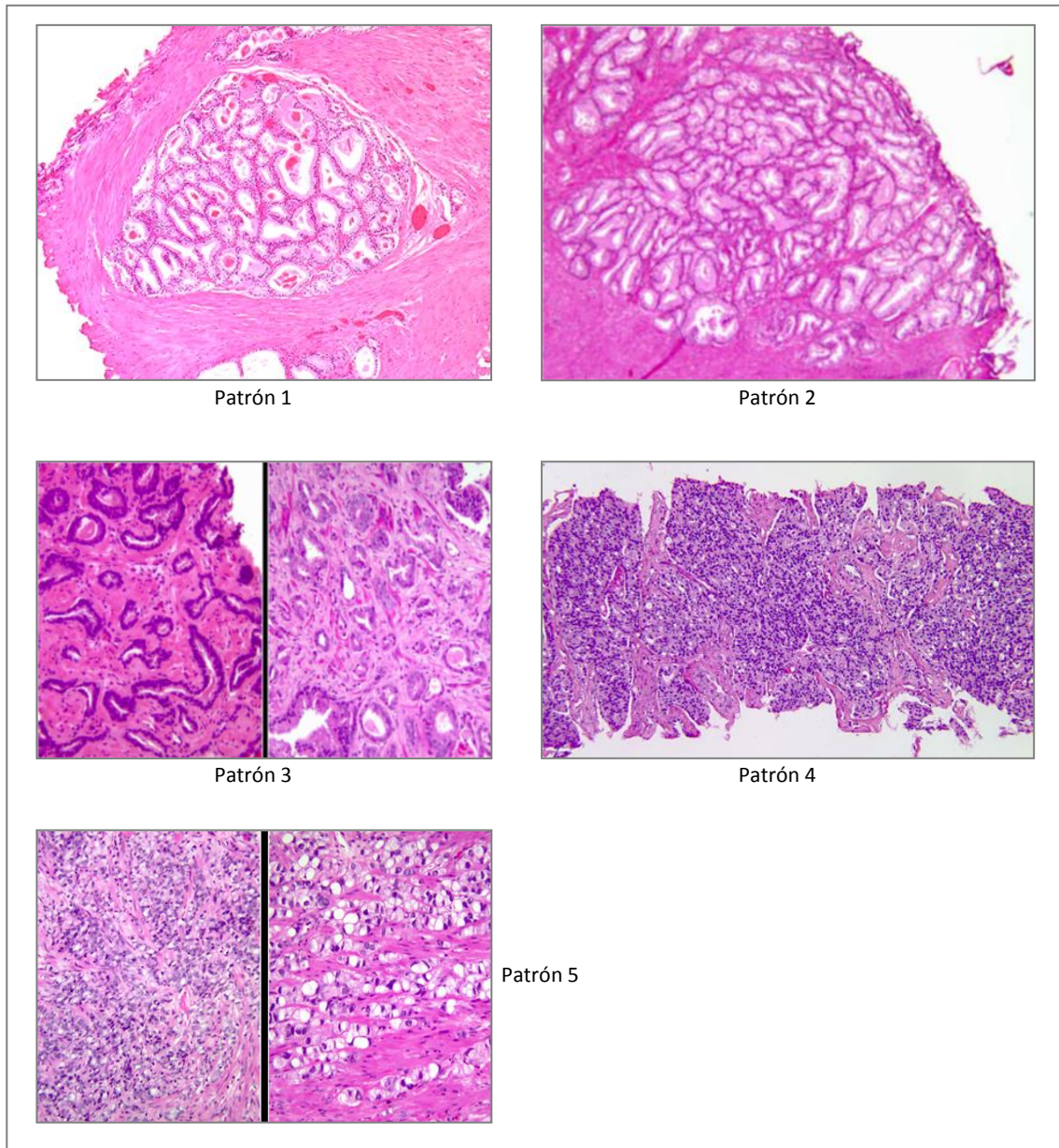


Figura 1-27. Gradación histológica de Gleason. [www.elsevier.es](http://www.elsevier.es)

Un estudio reciente ha demostrado la mejora de la concordancia de patrón y el cambio de grupos de pronóstico para la clasificación del Gleason modificado <sup>244</sup>. De

acuerdo con la convención internacional actual, la puntuación del Gleason modificado consiste en el grado de Gleason del componente de carcinoma dominante (más extenso), más el segundo grado inferior más común si dos grados están presentes. Si tres grados están presentes, la puntuación de Gleason consiste en el grado más común, más el grado más alto, independientemente de su extensión (sin regla del 5%) Cuando el carcinoma se compone principalmente de grado 4/5, la identificación de una pequeña porción (<5% de la carcinoma) de Gleason de grado 2 o 3 debe ser ignorada. Un diagnóstico de Gleason 4 o inferior, no se debe dar en las biopsias de próstata <sup>243</sup>. Debe ser comentada la presencia de carcinoma intraductal, invasión linfovascular y extensión extraprostática. Además de un informe de las características del carcinoma de cada sitio de la biopsia, un Gleason global basado en los hallazgos de las biopsias individuales se suele proporcionar.

La proporción (porcentaje) o la longitud (en milímetros) de la afectación del tumor en los cilindros obtenidos se correlaciona con el volumen del tumor, extensión extraprostática, y el pronóstico después de la prostatectomía <sup>245, 246</sup>. Una afectación mayor de 5 mm o mayor del 50% de adenocarcinoma en un cilindro se utiliza como un punto de corte para decidir tratamiento inmediato frente a la vigilancia activa en pacientes con Gleason de 6. Por estas razones informar sobre la afectación de los cilindros (en milímetros o en porcentaje) es importante ya que tiene valor pronóstico <sup>247</sup>.

El hallazgo de un pequeño foco de adenocarcinoma en un único cilindro deberá indicarse claramente (<1 mm o <1%), ya que esto podría ser relevante para su posterior seguimiento previo a futuras terapias, ya que además este hallazgo se asocia con un mayor riesgo de cáncer evanescente <sup>248, 249</sup>.

## 1.9 FACTORES PRONÓSTICOS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Los factores pronósticos son aquellos parámetros que pueden predecir la conducta biológica y la agresividad de un tumor <sup>250</sup>.

### 1.9.1 GRADO DE GLEASON EN LA BIOPSIA

La clasificación de adenocarcinoma de próstata convencional utilizando el sistema (modificado) de Gleason <sup>243</sup> es el factor pronóstico más fuerte de comportamiento clínico y de respuesta al tratamiento. Por tanto, la puntuación de Gleason es uno de los parámetros incorporados en nomogramas que predicen el riesgo de recurrencia después de la prostatectomía <sup>251</sup>. La puntuación de Gleason es la suma del más dominante y del segundo más dominante (en términos de volumen)

Si sólo hay un grado presente, el grado primario se duplica. Si el grado comprende <5% del volumen del cáncer, este grado no se incorpora en la puntuación de Gleason (regla del 5%) Tanto el primario como el secundario se informan además de la puntuación de Gleason, por ejemplo, Gleason 7 (4 + 3) Una puntuación de Gleason global se da cuando hay múltiples tumores, pero un foco tumoral separado con una puntuación de Gleason superior también debe ser mencionado. Un patrón de Gleason terciario con grado 4 o 5, en particular si excede de 5% del volumen de CP, es un pronóstico desfavorable e indicador de recidiva bioquímica. La presencia de un patrón terciario y su proporción aproximada de volumen tumoral también debe ser reportado <sup>252</sup>, además de la puntuación de Gleason.

### 1.9.2 EXTENSIÓN EXTRAPROSTÁTICA

Se refiere a la presencia de tumor más allá de los límites de la próstata. La extensión extraprostática es definida como carcinoma mezclado con tejido adiposo periprostático, o tejido que sobresale hacia fuera más allá de los contornos de la glándula de la próstata, por ejemplo, en el paquete neurovascular. La invasión del cuello de la vejiga también se considera como extensión extraprostática. Es útil no

sólo la ubicación, sino también el grado de extensión extraprostática porque la extensión está relacionada con el riesgo de recurrencia <sup>254</sup>.

Para la definición de la extensión tumoral se emplea la clasificación del 2009 TNM (Tumor Node Metastasis) (Tabla 1-4) de la UICC (unión internacional contra el cáncer) <sup>253</sup>.

Tabla 1-4. TNM 2009

<b>TUMOR PRIMARIO</b>	TX: Tumor primario no puede ser evaluado
	T0: No hay prueba de tumor primario
	T1: Tumor clínicamente no aparente, no palpable ni visible mediante imágenes
	T1a: Descubrimiento histológico incidental del tumor en ≤ 5% del tejido reseado
	T1b: Descubrimiento histológico incidental del tumor en >5% del tejido reseado
	T1c: Tumor identificado por biopsia de aguja debido a elevación de PSA
	T2: Tumor confinado dentro de la próstata
	T2a: El tumor afecta al 50% del lóbulo o menos
	T2b: El tumor afecta a más del 50% del lóbulo pero no a ambos lóbulos
	T2c: El tumor afecta a ambos lóbulos
	T3: El tumor se extiende a través de la cápsula prostática
	T3a: Extensión extracapsular (unilateral o bilateral)
	T3b: El tumor invade la(s) vesícula(s) seminal(es)
	T4: EL tumor esta fijo o invade estructuras adyacentes distintas a las vesículas seminales: el cuello de la vejiga, el esfínter externo, el recto, los músculos elevadores o la pared de la pelvis
<b>GANGLIOS LINFATICOS REGIONALES</b>	NX: Ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
	N0: No existe metástasis ganglionar linfática regional
	N1: Metástasis en ganglio(s) linfático(s) regional(es)
<b>METÁSTASIS A DISTANCIA</b>	MX: Metástasis a distancia no puede ser evaluada
	M0: No hay metástasis a distancia
	M1: Metástasis a distancia *
	M1a: Ganglio(s) linfático(s) no regional(es)
	M1b: Hueso(s)
	M1c: Otro(s) sitio(s) con enfermedad ósea o sin esta

\* Cuando más de un lugar de metástasis está presente se usa la categoría más adelantada.

El primer nivel de evaluación es la estadificación del tumor local porque la distinción entre órgano-confinados (T1-T2) y (T3-T4) enfermedad extraprostática tiene el impacto más importante en las decisiones de tratamiento.

En el ápex de la próstata, la mezcla de tumor con el músculo esquelético no constituye extensión extra-prostática. En el cuello de la vejiga, la invasión microscópica de pequeñas fibras de músculo liso no es equiparable a la invasión de la pared de la vejiga debido a que no lleva significación pronóstica independiente para recurrencia del PSA <sup>255</sup> y debe registrarse como extensión extraprostática (pT3a) Un margen positivo en el cuello de la vejiga debe ser informado como una extensión extra-prostática (pT3a) con margen positivo, y no como enfermedad pT4. El estadio pT4 sólo se puede asignar cuando el tumor invade la pared muscular de la vejiga <sup>256</sup>.

### **1.9.3 VOLUMEN TUMORAL**

El valor pronóstico independiente del volumen de CaP en la pieza de PR no se ha establecido. Sin embargo, un volumen con punto de corte de 0,5 ml sigue siendo un parámetro importante para distinguir tumor insignificante de cáncer clínicamente relevante <sup>257</sup>. La mejora continua en las imágenes de la glándula prostática ha permitido una medición más precisa del volumen de cáncer antes de la cirugía. Por lo tanto, se puede recomendar identificar la mayor dimensión del nódulo tumoral a estudio y hacer un cálculo aproximado del porcentaje de tejido de cáncer de próstata posiblemente afecto.

### **1.9.4 MARGEN QUIRÚRGICO**

El estado de los márgenes quirúrgicos es un factor de riesgo independiente para la recidiva bioquímica. El margen es positivo si las células tumorales están en contacto con la tinta en la superficie de la muestra, y es negativo si las células tumorales están muy cerca de la superficie tintada del margen <sup>258</sup> o cuando están en la superficie del tejido carente de cualquier de tinta.

En los tejidos que tienen artefactos por aplastamiento graves (por lo general en el ápice), puede que no sea posible asignar un estado de los márgenes quirúrgicos <sup>259</sup>. El estado de los márgenes quirúrgicos es independiente del estadio patológico, y un margen positivo no es evidencia de extensión extraprostática <sup>260</sup>. No hay pruebas suficientes para demostrar una relación entre la extensión de margen positivo y el riesgo de recurrencia. Sin embargo, se debe dar alguna indicación de la multifocalidad y el grado de positividad margen, como la extensión lineal en milímetros, o el número de bloques con márgenes positivos.

### **1.9.5 PSA**

Los niveles de PSA en suero aumentan con el estadio tumoral. Sin embargo, los niveles de PSA que se miden en un paciente individual parecen tener una capacidad limitada para predecir el estadio patológico final con precisión. Como el PSA es producido tanto por la HBP como por tejido prostático maligno, no existe una relación directa entre la concentración de PSA en suero y estadios clínicos y patológicos tumorales. De la biopsia, el porcentaje de tejido con cáncer es el predictor más fuerte de márgenes quirúrgicos positivos, de invasión de vesícula seminal y de enfermedad no órgano-confinada. Un mayor número de biopsias positivas es un predictor independiente de extensión extra-prostática, márgenes positivos y de invasión de los ganglios linfáticos <sup>261</sup>.

### **1.9.6 INVASIÓN VESÍCULAS SEMINALES**

La invasión de las vesículas seminales es predictor de recidiva local y a distancia. La biopsia de las vesículas seminales puede utilizarse para aumentar la precisión de la estadificación pre-operatoria. Esto no se recomienda como un examen de primera línea, pero debe reservarse para los pacientes con un riesgo sustancial de SVI en quien una biopsia positiva modificaría las decisiones de tratamiento. Los pacientes con un estadio clínico mayor de T2a y un nivel de PSA en suero de más de 10 ng / ml podrían ser candidatos para biopsiar las vesículas seminales <sup>262</sup>. Los pacientes con

biopsias de próstata positivas son más propensos a tener biopsias de vesículas seminales positivas.

### **1.9.7 MESTÁSTASIS EN NÓDULOS LINFÁTICOS**

La metástasis en nódulos linfáticos es un marcador pronóstico independiente y adverso bien establecido <sup>258, 263</sup>. Es un componente de los nomogramas <sup>251, 264</sup> comúnmente usados para predecir el riesgo de recurrencia tras prostatectomía. Los intentos de estratificar a los pacientes en grupos de riesgo basados en factores adicionales de la implicación de nódulos linfáticos ha dado lugar a resultados contradictorios <sup>263</sup>.

## **1.10 MODELOS PRONÓSTICOS/GRUPOS DE RIESGO**

Como he explicado anteriormente existen múltiples variables que conllevan una importante información predictiva de pronóstico. Epstein introdujo el criterio clínico para predecir la presencia de lo que denomino cáncer de próstata insignificante. Lo definía como T1c con Gleason  $\leq 6$ , que afecta a menos de 3 cilindros, con  $\leq 50\%$  de afectación de cada cilindro y finalmente, con dPSA  $>0,15$  ng/ml/g.

Las clasificaciones predictivas de cáncer de próstata se estratifican habitualmente en base a tres parámetros muy concretos: el valor del PSA, el estadio clínico de acuerdo a la clasificación TNM, y la suma del Gleason de la biopsia de próstata.

Basándose en estos parámetros se construyen las clasificaciones de riesgo que se manejan: grupos de riesgo D'Amico <sup>265</sup>, grupos de riesgo de la NCNN (National Cancer Comprehensive Network), y los grupos de riesgo de la Unión Internacional contra el cáncer (UICC)-TNM 2010 <sup>266</sup> (Tabla 1-5)

Tabla 1-5. Grupos pronósticos de cáncer de próstata

Grupos de Riesgo D'Amico <sup>265</sup>					
<b>Bajo Riesgo</b>	cT1c – cT2a	y	Gleason < 7	y	PSA ≤ 10 ng/mL
<b>Riesgo intermedio</b>	cT2b	o	Gleason 7	o	PSA > 10 y ≤ 20 ng/mL
<b>Alto riesgo</b>	≥ cT2c	o	Gleason ≥ 8	o	PSA > 20 ng/mL

Grupos Pronósticos UICC/TNM-2010 <sup>266</sup>					
<b>I</b>	T1a – c	N0	M0	PSA < 7	Gleason < 7
	T2a	N0	M0	PSA < 10	Gleason < 7
	T1 – T2a	N0	M0	PSA X	Gleason X
<b>IIA</b>	T1a – c	N0	M0	PSA < 20	Gleason = 7
	T1a – c	N0	M0	10 ≤ PSA ≤ 20	Gleason < 7
	T2a	N0	M0	PSA < 20	Gleason < 8
	T2b	N0	M0	PSA < 20	Gleason < 8
	T2b	N0	M0	PSA X	Gleason X
<b>IIB</b>	T2c	N0	M0	Cualquier PSA	Cualquier Gleason
	T1 – T2	N0	M0	PSA ≥ 20	Cualquier Gleason
	T1 – T2	N0	M0	Cualquier PSA	Gleason > 7
<b>III</b>	T3a-b	N0	M0	Cualquier PSA	Cualquier Gleason
<b>IV</b>	T4	N0	M0	Cualquier PSA	Cualquier Gleason
	Cualquier T	N1	M0	Cualquier PSA	Cualquier Gleason
	Cualquier T	Cualquier N	M1	Cualquier PSA	Cualquier Gleason

Estos patrones son bastante intuitivos, fáciles de recordar y se correlacionan adecuadamente con el pronóstico.

Estos modelos pronósticos no solo se crean como grupos de riesgo, sino que existen también nomogramas, modelos predictivos multivariantes, relacionados con el pronóstico tras el diagnóstico y tratamiento de un cáncer de próstata. Esto es así porque la estratificación por grupos de riesgo tiene algunas limitaciones y son menos exactos que los modelos predictivos multivariantes. Con respecto a los nomogramas más usados, las tablas de Partin fueron el primer método empleado para aconsejar a pacientes diagnosticados de cáncer antes de tomar decisión terapéutica. Combinan el estadio clínico, Gleason y PSA con la intención de predecir el estadio histopatológico postoperatorio (enfermedad confinada al órgano, extensión extraprostática, invasión de vesículas seminales y posibilidad de metástasis ganglionares).<sup>251</sup>

Con respecto a las clasificaciones en función de grupos de riesgo, una de las más usadas es la clasificación de grupos de riesgo de D'Amico. En un estudio comparativo

sobre 1976 pacientes sometidos a prostatectomía radical, en el que comparo varios grupos de riesgo entre los que estaban el de D'Amico, se observó que este último solo podía establecer tres estratos (bajo riesgo, intermedio y alto) Esto hacia que la supervivencia libre de enfermedad a los 3 años fuera del 93%, 72% y 44% respectivamente. Esto quería decir que todos los pacientes son encasillados en una de estas tres posibilidades sin poder hacer una mayor individualización <sup>267</sup>.

A pesar de que existen múltiples modelos disponibles, siguen teniendo limitaciones como son el hecho de que estos modelos no son exactos y en ocasiones pueden fallar. Como consecuencia no predicen con exactitud el riesgo de desarrollo de metástasis o de muerte por cáncer. Además deberíamos usar aquellos que una vez testados en nuestro medio tengan una buena capacidad de discriminación y conocer bien su calibración para ver si infraestiman o sobreestiman la realidad.

## **1.11 TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA**

La evolución natural del cáncer de próstata varía desde la enfermedad indolente asintomática durante toda la vida del paciente hasta el cáncer de alto grado de agresividad que da metástasis rápidamente y lleva a la muerte con gran sufrimiento. En la elección del tratamiento se debe evaluar el potencial de malignidad del tumor y el estado general de la salud, la expectativa de vida y las preferencias de calidad de vida del paciente. Los pacientes con tumores de bajo potencial de malignidad responden mejor a los tratamientos. Por lo tanto, los resultados del tratamiento en cualquier serie de pacientes dependerán del potencial de malignidad del tumor y del método aplicado.

### **1.11.1 CÁNCER DE PRÓSTATA LOCALIZADO T1-T2C**

La mayoría de los casos de cáncer de próstata no causarán la muerte del individuo debido a su lento crecimiento, por lo que la mayoría de los pacientes afectados morirán por otras causas diferentes al cáncer prostático. El tratamiento conservador

del cáncer de próstata se plantea para hombres con una esperanza de vida de menos de 10 años, ya que es improbable que se beneficien y/o toleren un tratamiento agresivo <sup>268</sup>. En aquellos pacientes con cáncer de próstata clínicamente localizado de bajo riesgo (cT1-2a, PSA  $\leq$ 10, Gleason  $\leq$ 6,  $\leq$ 2 cilindros positivos con  $\leq$ 50% de tumor por cilindro), la vigilancia activa (el tratamiento sintomático retrasado no curativo de pacientes que no son candidatos para una terapia local agresiva) se contempla como una opción terapéutica conservadora encaminada a reducir el sobretratamiento <sup>269, 270</sup>. Se ha visto que la vigilancia activa con tratamiento ante evidencia de un rápido incremento en niveles de PSA, o aumento de volumen o grado del tumor, está asociada con un bajo riesgo (3%) de muerte por cáncer de próstata <sup>270</sup>.

La prostatectomía radical laparoscópica o robótica constituye la opción terapéutica de primera línea en pacientes operables con enfermedad localizada <sup>271</sup>. Este tratamiento conlleva un beneficio en la supervivencia específica frente a la vigilancia activa <sup>272</sup>. Con las técnicas de cirugía laparoscópica y robótica la recuperación es más temprana considerándose como primera opción de técnicas quirúrgicas.

El bloqueo androgénico neoadyuvante no confiere una ventaja en la supervivencia total ni en el tiempo libre de progresión y por tanto no tiene un papel en el tratamiento quirúrgico de la enfermedad <sup>273</sup>. Sin embargo, los datos publicados sobre el bloqueo androgénico adyuvante tras prostatectomía radical son contradictorios. Messing et al. <sup>274</sup> concluyen que existen ventajas en la supervivencia de pacientes con nódulos linfáticos positivos. En cambio, otros estudios no describen beneficios <sup>275</sup>.

La radioterapia postoperatoria inmediata podría mejorar significativamente la supervivencia clínica o biológica a 5 años en un 20% ( $p < 0.0001$ ) en los pacientes con márgenes positivos o recidiva local <sup>276</sup>. El estadiaje de los ganglios linfáticos solo es necesario cuando un tratamiento curativo se planea <sup>277</sup>. Los pacientes con un estadio T2 o menor, PSA  $< 20$  ng/dl y un Gleason  $\leq 6$  tienen menos de un 10 % de posibilidades de tener metástasis y por lo tanto no está indicada la linfadenectomía.

La radioterapia ajustada tridimensional es la modalidad de referencia. La radioterapia de intensidad modulada está siendo cada vez más utilizada) En ella, la intensidad y frecuencia de la dosis de radiación a aplicar varía dependiendo del grupo de riesgo <sup>278, 279, 280</sup>. La braquiterapia se contempla también como una opción terapéutica segura y eficaz para pacientes de bajo riesgo <sup>281</sup>.

### **1.11.2 CÁNCER DE PRÓSTATA LOCALMENTE AVANZADO T3-T4 N0-N1**

El bloqueo androgénico concurrente más adyuvante durante 3 años representa el estándar en el tratamiento radioterápico del cáncer de próstata de alto riesgo <sup>278</sup>. Se recomienda aplicar  $\geq 74$  greys en 37 fracciones <sup>279</sup>. El bloqueo adyuvante indefinido seguido a la radioterapia se recomienda en pacientes con más de 2 ganglios linfáticos regionales positivos (ganglios de cadenas ilio-obturatrices) <sup>278</sup>. Además el comienzo inmediato del bloqueo prolonga la supervivencia global<sup>274</sup>.

En estos casos la cirugía radical es una opción en pacientes con tumor T3c o Gleason 8-10 o PSA <20 ng/dl y una esperanza de vida > 10 años<sup>282</sup>.

El tratamiento hormonal en monoterapia no está indicado si el paciente es subsidiario de recibir radioterapia. Se podría aplicar a pacientes sintomáticos, con tumor T3-T4 extenso, PSA > 25-50), y una velocidad de duplicación del PSA < 1 año <sup>283</sup>.

Cuando el paciente presenta adenopatías regionales el tratamiento hormonal se puede diferir si el varón está asintomático, y presenta un PSA < de 20-50 y una velocidad de duplicación > 1 año <sup>284</sup>.

### **1.11.3 CÁNCER DE PRÓSTATA METASTÁSICO M+**

La terapia hormonal adyuvante tiene como objetivo disminuir el efecto que tienen los andrógenos en el crecimiento del tumor prostático. Por ello como procedimiento simple de bajo riesgo y que proporciona los niveles de castración más rápidos (12 horas) se realiza orquiectomía (castración quirúrgica) aunque poco a poco va siendo

reemplazada por otras alternativas médicas (castración médica) de menor impacto físico y psicológico <sup>285</sup>.

Por el descubrimiento de la dependencia hormonal del cáncer de próstata se le otorgó a Huggins el premio Nobel en 1966, y en 1971 Schally y Guillemin aislaron la estructura molecular de la LHRH y en 1973 sintetizaron el primer análogo de la LHRH, la triptorelina, mediante la sustitución de un aminoácido en la posición 6 de su estructura, recibiendo el premio Nobel en 1977.

Actualmente se usan los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) como método de elección para conseguir niveles anorquídeos de testosterona en suero <sup>285</sup>.

La estimulación cíclica de la adenohipófisis por GnRH endógena estimula la liberación de la hormona luteinizante (LH), que a su vez estimula la síntesis de andrógenos. La administración continuada de agonistas de GnRH suplanta el efecto de la hormona endógena, y se cree que disminuye la expresión de sus receptores en la hipófisis, dando lugar a niveles de testosterona de castración en tres semanas. Estos niveles son una testosterona < de 50 ng/dl. La administración de niveles elevados de estrógenos o progesterona resulta en una supresión similar en la liberación de LH a través de la retroinhibición del eje hipotalámico-hipofisario <sup>286</sup>. Antagonistas del receptor de andrógeno (como flutamida o bicalutamida) e inhibidores de la síntesis de andrógenos (como ketoconazol o finasteride) son usados frecuentemente, solos o combinados con la castración, para bloquear el efecto de los andrógenos.

En pacientes con enfermedad sintomática metastásica, se usan frecuentemente antagonistas del receptor de andrógenos al inicio y conjuntamente con los agonistas de GnRH, para prevenir los efectos adversos de la elevación inicial de testosterona. La terapia androgénica tiene beneficio sobre la supervivencia total, el dolor óseo, la obstrucción ureteral, la compresión de la médula espinal y suprime los niveles de PSA en un 80-90% de los pacientes con cáncer de próstata metastásico. No obstante

también tiene efectos adversos, como la desmineralización ósea, incremento en el riesgo de fracturas<sup>287</sup>, sofocos o la pérdida de la función sexual y la libido entre otros<sup>285</sup>.

#### **1.11.4 CÁNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE A CASTRACIÓN**

La definición consiste en niveles adecuados de castración en sangre, con tres aumentos consecutivos del PSA separados una semana, resultando en dos aumentos del 50% sobre el nadir, con un PSA > 2 ng/dl. Se tiene que haber retirado el antiandrógeno 4 o 6 semanas según el tipo, y progresión del PSA a pesar de las maniobras hormonales.

En estos momentos los pacientes deben ser tratados por un equipo multidisciplinar y comenzar con primera línea de quimioterapia basada en el Docetaxel. La dosis de inicio es 75mg/m<sup>2</sup> semanalmente combinada con prednisona 5mg, en 10 ciclos. Con este tratamiento se consigue una media de supervivencia de 18.91 meses<sup>288</sup>.

Si con el docetaxel los pacientes progresan por mal control del dolor, o presencia de metástasis viscerales y anemia se comienza con una segunda línea de quimioterapia. Los fármacos de elección son el acetato de abiraterone, cabazitaxel y enzalutamida.

La abiraterona es un inhibidor de CYP17 que se usa en combinación con prednisona 2 veces al día (10 mg/24h) Bloquea la síntesis de andrógenos en las adrenales, testículos y tumor prostático. Según un estudio de Bono et al, tras una media de seguimiento de 20,2 meses la media de supervivencia en el grupo de abiraterona era de 15.8 meses frente a los 11,2 meses del grupo placebo (HR 0,74, p< 0,001)<sup>289</sup>. Este fármaco ya está aprobado para su uso en pre quimioterapia desde el año 2012.

La enzalutamida (MDV3100) es un nuevo antiandrógeno que bloquea la transferencia del receptor androgénico al núcleo. Se aprobó en 2013 por la FDA para su uso tras el docetaxel<sup>290</sup>.

En los pacientes con metástasis óseas han de aplicarse agentes que protejan los huesos tales como el ácido zolendrónico o el denosumab. Este último se asocia a un aumento de la densidad ósea y a una reducción de la incidencia de nuevas fracturas vertebrales <sup>291</sup>.

## 2 HIPÓTESIS

---



La hipótesis del estudio supone la existencia de una relación entre padecer cáncer de próstata y presentar el polimorfismo C/T rs 198977 del gen *KLK2*, considerando los niveles séricos de la proteína hK2 como factor independiente, en pacientes con criterios de cribado poblacional positivo para cáncer de próstata.

Así mismo supone la existencia de una asociación entre el polimorfismo C/T rs 198977 y el % PSA libre/total.



## **3 OBJETIVOS**

---



### 3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Analizar la relación entre el polimorfismo C/T rs 198977 del gen *KLK2* , los niveles en sangre de la proteína hK2 y las formas libre, total y ligada del PSA con el diagnóstico de adenocarcinoma de próstata en la biopsia transrectal.

### 3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Analizar si existe relación entre la frecuencia genotípica del polimorfismo C/T rs 198977 y la proteína hK2.
2. Analizar la relación de los niveles de la proteína hK2 y el polimorfismo C/T rs198977 con los parámetros clínicos utilizados en la práctica habitual (edad, tacto rectal, tipo histológico, grupo pronóstico, estadio clínico, hallazgos ecográficos y formas moleculares del PSA)
3. Crear un modelo matemático predictivo del resultado de la biopsia prostática transrectal, en pacientes con cribado positivo para cáncer de próstata, combinando 4 calicreínas: PSA libre, total, ligado y hK2, además de la edad y el tacto rectal. Con este modelo se podría disminuir el número de biopsias prostáticas innecesarias y las complicaciones asociadas a este procedimiento.



## 4 MATERIAL Y MÉTODOS

---



## 4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO Y PACIENTES

### DISEÑO DEL ESTUDIO

Este trabajo se ha realizado en el seno de un equipo multidisciplinario compuesto por el Servicio de Urología del Hospital Universitario Severo Ochoa, el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Severo Ochoa, la Sección de Genómica del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico San Carlos y la Unidad de apoyo a la Investigación del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Los pacientes que forman parte de este estudio fueron reclutados durante el periodo comprendido entre mayo del año 2012 y mayo del 2014.

El diseño del estudio se adaptó a las líneas de actuación descritas en la Declaración de Helsinki para la investigación biomédica y los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética e Investigación Clínica de Hospital Universitario Severo Ochoa (Ver Anexo 2)

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

A todos los participantes, se les solicitó permiso para ser incluidos en el correspondiente estudio mediante un consentimiento informado en el que se explicaban los objetivos del mismo. También se dejó constancia de la posibilidad de abandonar el estudio en cualquier momento del mismo, sin perjuicio alguno de cara a la asistencia facultativa que pudieran precisar (Ver Anexo 2)

### POBLACIÓN A ESTUDIO

Se trata de un estudio de cohorte única prospectiva unicéntrica. Consta de un total de 419 pacientes atendidos en las consultas de urología del Hospital Severo Ochoa. El tamaño de la muestra ha sido calculado estableciendo un error de tipo I (alfa) de 0,05 y un error tipo II (beta) de 0,20. Hemos partido de una especificidad para el PSA total > 4ng/ml de 75% (16), con un número de biopsias prostáticas de 450 al año. Se estima

que se requieren para el estudio 434 pacientes, pero considerando un 5% de pérdidas previsibles, hemos aumentado a 451 para tener un margen de seguridad en los resultados.

**Criterios de inclusión:**

Pacientes que cumplan algunos de los criterios de realización de biopsia prostática según protocolos de cribado poblacional del Hospital Severo Ochoa, basados en las actuales guías europeas.

- Tacto rectal sospechoso: si presenta un nódulo palpable, induración, asimetría o borramiento del surco.
- PSA alterado:
  - o 40-50 años  $\geq 3\text{ng/ml}$
  - o 51-70 años  $\geq 4\text{ng/ml}$
  - o  $>71$  años  $\geq 5\text{ng/ml}$
  - o 40-50 años con antecedentes familiares de CP:  $\geq 2'5\text{ng/ml}$  y VPSA  $> 0'75$  año
- Anatomía patológica previa con:
  - o ASAP: pequeños grupos glandulares atípicos que se han asociado hasta en un 50% de casos con cáncer de próstata
  - o PINAG: Neoplasia intraepitelial de alto grado, precursora de cáncer prostático

**Criterios de exclusión:**

- Pacientes que no cumplan los criterios de inclusión.
- Comorbilidad asociada: determinada por escala a cuatro años de mortalidad<sup>292</sup> (Tabla 4-1)

Tabla 4-1. Sei J. Lee, MD, Karla Lindquist, MS Mark R. Segal, PhD, Kenneth E. Covinsky, Development and Validation of a Prognostic Index for 4-Year Mortality in Older Adults. AMA, February 15, 2006—Vol 295, No. 7. Escala de mortalidad en 4 años para adultos mayores de 60 años

INDICE DE MORTALIDAD EN 4 AÑOS PARA ADULTOS MAYORES DE 60 AÑOS				
1	Edad	60-64	1 Punto	
		65-69	2 Puntos	
		70-74	3 Puntos	
		75-79	4 Puntos	
		80-84	5 Puntos	
		≥ 85	7 Puntos	
2	Sexo (Varón/Mujer)	Varón	2 Puntos	
3	a	Peso		
	b	Altura		
		BMI = 703 x (Peso en libras / Altura en pulgadas)	BMI < 25	1 Punto
4	¿Le ha comunicado su doctor alguna vez que tiene diabetes un índice alto de azúcar en sangre? (S/N)	Diabetes	1 Punto	
5	¿Le ha comunicado su doctor alguna vez que tiene cáncer o un tumor maligno, excluyendo cánceres de piel menores? (S/N)	Cáncer	2 Puntos	
6	¿Tiene usted alguna discapacidad pulmonar que limite sus actividades cotidianas o le obliguen a necesitar oxígeno en casa? (S/N)	Discapacidad Pulmonar	2 Puntos	
7	¿Le ha comunicado el doctor que tiene una insuficiencia cardiaca? (S/N)	Insuficiencia Cardiaca	2 Puntos	
8	¿Ha fumado durante la última semana? (S/N)	Si fumó	2 Puntos	
9	A causa de un problema de salud o de memoria ¿tiene usted alguna dificultad con tomar un baño o una ducha? (S/N)	Si hay problema	2 Puntos	
10	A causa de un problema de salud o de memoria ¿tiene usted alguna dificultad para controlar su dinero? Por ejemplo a la hora de pagar sus facturas o mantener un seguimiento de sus gastos (S/N)	Si hay problema	2 Puntos	
11	A causa de un problema de salud, ¿tiene usted dificultad para caminar durante un tiempo? (S/N)	Si tiene dificultad	2 Puntos	
12	A causa de un problema de salud ¿tiene usted alguna dificultad para mover objetos de su casa? Como por ejemplo una silla del comedor (S/N)	Si tiene dificultad	2 Puntos	

**Variables a analizar:**

- *Variable dependiente:* biopsia positiva para adenocarcinoma de próstata, negativa para adenocarcinoma de próstata o ASAP/PINAG.
- *Variables independientes:*
  - Proteína hK2 en suero
  - Polimorfismo C/T 198977: homocigótico C/C, T/T y heterocigótico C/T.
- *Covariables:*
  1. PSA total
  2. PSA libre
  3. PSA complex
  4. Cociente PSA libre / total
  5. Cociente hK2/PSA total
  6. Cociente hK2/PSA libre
  7. Cociente hK2xPSA total/PSA libre
  8. Grados de Gleason: obtenido en la biopsia, y tras la pieza de prostatectomía radical. No todos los pacientes se operan, algunos reciben radioterapia y bloqueo androgénico por lo que en estos casos no dispondremos del Gleason de la pieza quirúrgica. Se valoran los dos patrones de crecimiento más frecuentes por separado definiendo un patrón primario (predominante) y un patrón secundario (segundo más prevalente) Se valora cada patrón de 1 a 5 desde el más diferenciado al menos, y se suman. El Gleason varía, pues, desde 2 hasta 10.
  9. Estadio clínico tumoral: puede oscilar de T1 (tumor no palpable) a T4 (invasión de estructuras adyacentes) Clasificación TMN 2009 (ver pág. 103)  
  
Para agrupar los tumores según el estadio clínico que se obtiene de la biopsia, se clasifican en 2 grupos: tumores organoconfinados y tumores localmente avanzados.

Los tumores organoconfinados se subdividen según los estadios clínicos: los tumores con estadios clínicos que comprenden el T1c y T2a, y los tumores con estadios T2b y T2c.

Las neoplasias de próstata con estadio T3a o superior corresponden a tumores localmente avanzados.

Estadio de la pieza quirúrgica: pT obtenido de la anatomía patológica.

Clasificación TMN 2009.

% de afectación tumoral en la biopsia

10. Nº cilindros afectados

11. Margen quirúrgico positivo

12. Tacto rectal: se considera sospechoso si presenta un nódulo palpable, induración, asimetría o borramiento del surco.

13. Hallazgos de la ecografía transrectal: tamaño prostático (diámetros longitudinal, transversal y anteroposterior), volumen y densidad del PSA.

14. Edad

15. Clasificación de D'Amico: se dividen en tres grupos de riesgo: riesgo bajo, medio y alto (ver pág. 107)

\* Las variables cuantitativas se han dividido por cuartiles para un análisis más exhaustivo.

### **Recogida de muestras:**

Se extrajeron 3 muestras:

a) 2 tubos de sangre periférica de 4 ml con EDTA:

- En uno se realizarán las mediciones de las distintas formas moleculares del PSA (libre, total, ligado y ratio)
- En el otro se extraerá el ADN para identificar el polimorfismo del gen.

- b) 1 tubo de sangre periférica con separador de gelosa de 5ml para obtener suero y medir la proteína hK2. Se centrifugará a 3000 r.p.m., durante 10 min. y se separará en alícuotas de plasma y suero. Se conservaran en nevera a -20°C hasta su determinación.

## 4.2 PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO

- TACTO RECTAL: consistencia y tamaño de la próstata.
- ECOGRAFÍA TRANSRECTAL: a través de una sonda rectal de ultrasonidos se miden las dimensiones de la próstata y se localizan los posibles nódulos sospechosos para su posterior biopsia. Se considera nódulo sospechoso a toda imagen ecográfica hipo o hiperecoica sospechosa de malignidad.
- BIOPSIA PROSTÁTICA: guiada con la ecografía transrectal.

Con respecto al tipo de biopsia se han llevado a cabo dos tipos: extendida y no extendida. La extendida consiste en realizar 14 punciones de tejido prostático distribuidas en:

- 3 en lóbulo lateral derecho
- 3 en lóbulo derecho
- 3 en lóbulo izquierdo
- 3 en lóbulo lateral izquierdo
- 2 en zona medial periuretral

La no extendida consiste en realizar 8 punciones de tejido prostático distribuidas en:

- 4 lóbulo derecho
- 4 lóbulo izquierdo
- ESTUDIO HISTOLÓGICO: realizado en el laboratorio de Anatomía Patológica. Las muestras se incluyeron en parafina y se seccionaron posteriormente con micrótopo. Posteriormente se tiñeron en hematoxilina-eosina y se analizaron. En caso de dudas se realiza inmunohistoquímica con citoqueratina 34b12

como marcador de membrana celular, o con racemasa como marcadora de membrana celular y de citoplasma para distinguir las células tumorales.

\*A todos los pacientes se les realizo previamente a la biopsia una encuesta en la que se recoge información sobre diferentes cuestiones relativas a sus antecedentes clínicos personales, demográficos y sintomatología, que se enumeran a continuación: (Ver Anexo 2)

- Peso y talla para calcular el IMC: utilizamos la clasificación de la Sociedad Española para el estudio de la obesidad <sup>293</sup> (Tabla 4-2)

*Tabla 4-2. Clasificación de la obesidad según el índice de masa corporal (IMC) según la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO)*

Categoría	Índice de masa corporal
Normal	18,5 - 24,9
Sobrepeso grado I	25 - 26,9
Sobrepeso grado II (Preobesidad)	27 - 29,9
Obesidad tipo I	30 - 34,9
Obesidad tipo II	35 - 39,9
Obesidad tipo III (Mórbida)	40 - 49,9
Obesidad tipo IV (Extrema)	≥50

- Numero de biopsias realizadas anteriormente
- Historia familiar de cáncer de próstata
- Etnia: africana, latinoamericana o caucásica
- Presencia de síntomas del tracto urinario: nicturia, polaquiuria, flujo miccional disminuido, y/o están en tratamiento con alfa-bloqueantes (5ari)
- Comorbilidades. HTA, DM, consumo abundante de grasas y disfunción eréctil.
  - HTA: hemos considerado hipertensos todos los pacientes con tensión arterial mayor de 140/90, o sin son diabéticos aquellos con tensiones mayores de 135/85 <sup>294</sup> (Tabla 4-3)

Tabla 4-3. Clasificación de la hipertensión arterial en adultos según el documento conjunto de las Sociedades Europeas de Hipertensión y Cardiología, 2007

	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)
<b>Óptima</b>	<120	<80
<b>Normal</b>	120 - 129	80 - 84
<b>Normal - Alta</b>	130 - 139	85 - 89
<b>Hipertensión de grado 1</b>	140 - 159	90 - 99
<b>Hipertensión de grado 2</b>	160 - 179	100 - 109
<b>Hipertensión de grado 3</b>	≥180	≥110
<b>Hipertensión sistólica aislada</b>	≥140	<90

PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica

-Diabetes hemos considerado diabéticos aquellos pacientes que cumplieran criterios según las guías europeas de consenso sobre la diabetes.

Puntos de corte para el diagnóstico de diabetes mellitus, intolerancia a la glucosa y glucosa alterada en ayunas, basadas en muestras de sangre diferentes del plasma venoso estándar recomendado (Tabla 4-4)<sup>295</sup>

Tabla 4-4. 2hG: glucosa a las 2h poscarga; DM: diabetes mellitus; GA: glucosa en ayunas; GAA: glucosa alterada en ayunas; IG: intolerancia a la glucosa. \*Estándar

Diagnóstico	Plasma Venoso* mmol/l (mg/dl)	Sangre Venosa mmol/l (mg/dl)	Sangre capilar mmol/l (mg/dl)
<b>GAA-GA</b>	6,1 (110)	5,0 (90)	5,6 (101)
<b>IG-2Hg</b>	7,8 (140)	6,5 (117)	7,2 (130)
<b>DM-GA</b>	7,0 (126)	5,8 (104)	6,5 (117)
<b>DM-2hG</b>	11,1 (200)	9,4 (169)	10,3 (185)

## ENMASCARAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En la evaluación de las muestras el personal del laboratorio de bioquímica no conocía el diagnóstico anatomopatológico. Asimismo tampoco conocían el resultado de la biopsia el personal encargado del análisis de los genes, siendo por tanto un análisis doble ciego.

## 4.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

### 4.3.1 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Los análisis bioquímicos realizados en este estudio fueron:

- PSA total y PSA libre por el método de enzimoimmunoanálisis quimioluminiscente en fase sólida de DIPESA en autoanalizador IMMULITE.
- PSA total y PSA ligado por enzimoimmunoanálisis quimioluminiscente BAYER en un autoanalizador CENTAURO.
- hk2 medida en suero por método de enzimoimmunoanálisis

#### ANÁLISIS DEL PSA CON AUTOANALIZADOR CENTAURO:

Este trabajo se llevó a cabo en el Servicio de Bioquímica del Hospital Severo Ochoa en la unidad de Análisis Clínicos.

El análisis del PSA se divide en 4 fases (Figura 4-1):

La primera fase consiste en introducir un reactivo con anticuerpo marcado con éter de acridinio que se une al Antígeno (PSA)

La segunda fase es una fase solida con partículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpo específico. Se incuba a 37°C y las partículas paramagnéticas se unen al complejo Ag-Ac.

En la tercera fase la cubeta se expone a imanes que atraen las partículas paramagnéticas y se lavan.

La cuarta consiste en una reacción quimioluminiscente en ácido base. Mide la emisión de luz en unidades reactivas de luz (URL) Se cuantifica y se calcula la concentración de antígeno.

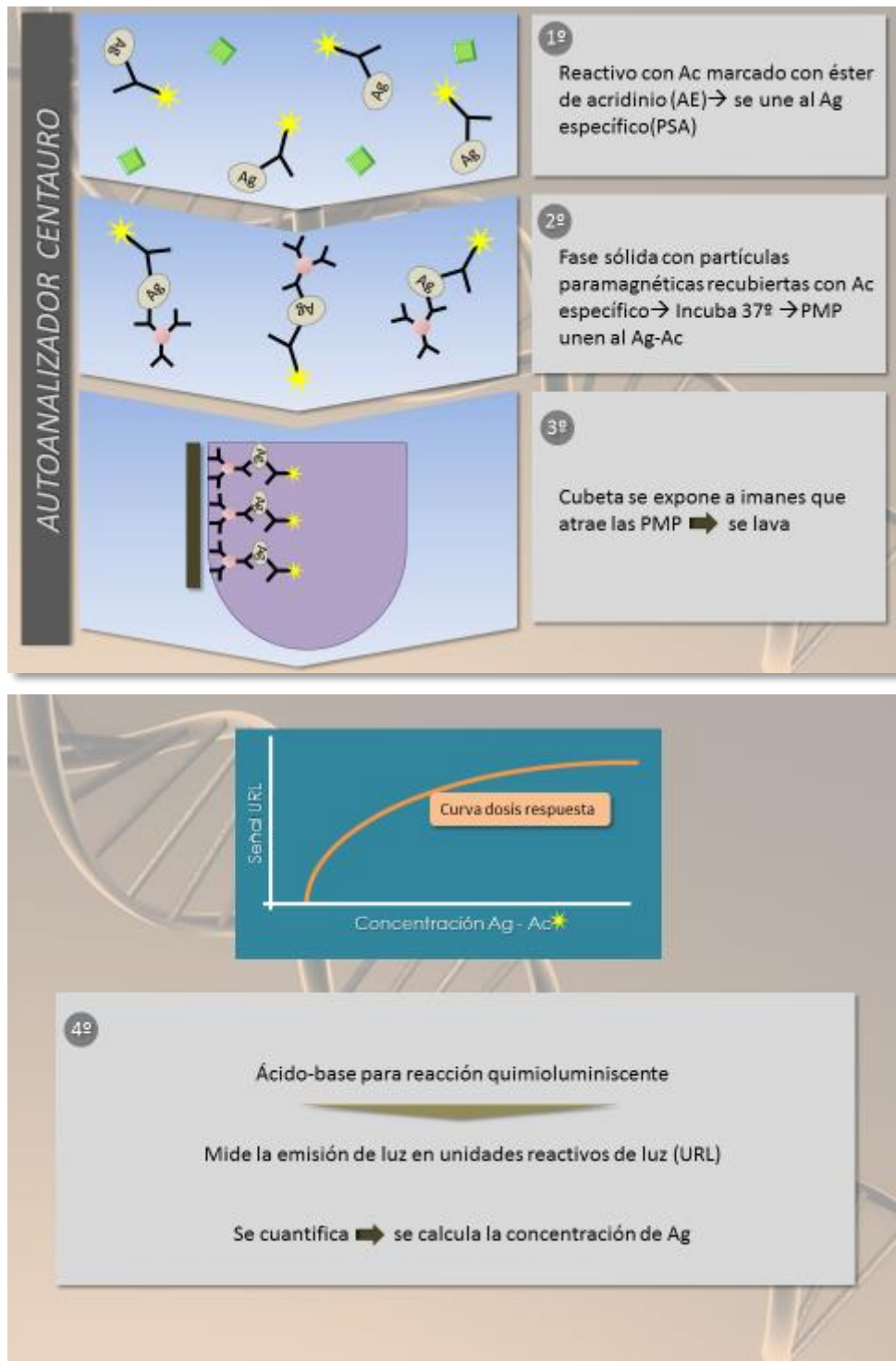


Figura 4-1. Fases del autoanalizador Centauro.

**ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA hK2:**

El estudio de los niveles en sangre de *hk2* se realizó a partir de muestras de suero sanguíneo obtenido de muestras de sangre periférica en la sección de Genómica del Hospital Clínico San Carlos.

Las muestras de suero fueron obtenidas mediante centrifugación de las muestras sanguíneas durante 15 minutos a 3.000 rpm. Tras este proceso, se realizaron 2 alícuotas de cada muestras de suero y se congelaron a -40°C hasta su procesamiento.

La valoración de los niveles de *hk2* se realizó mediante el enzimoimmunoanálisis tipo sándwich *Enzyme-linked Immunosorbent Assay kit For Kallikrein 2 (USCN Life Sciences Inc)* Este es un proceso en el que se usan anticuerpos para detectar los antígenos deseados, utilizando la unión específica antígeno-anticuerpo que es analizada a través del marcaje con una enzima específica. Esta enzima cataliza una reacción en la que el sustrato se transforma, generando un producto coloreado que puede cuantificarse mediante un espectrofotómetro.

El proceso se lleva a cabo en seis pasos diferenciados (Figura 4-2 y Figura 4-3) tras los que son necesarias diferentes incubaciones, a 37°C o a temperatura ambiente, para conseguir las reacciones enzimáticas correspondientes:

1. Se parte de una placa multi pocillo, preconjugada con un anticuerpo específico para *hk2* para que la reacción antígeno-anticuerpo quede inmovilizada.
2. Se añaden tanto las muestras de los pacientes como los controles y estándares incluidos en el kit. El antígeno presente en estas muestras se unirá al anticuerpo adherido a la placa.
3. Se incorpora un anticuerpo específico para *hk2* conjugado con biotina que también se une al antígeno presente en las muestras.
4. Se añade avidina conjugada con la enzima HPR (peroxidasa de rábano) que se une al anticuerpo marcado con biotina.

5. Se incorpora el sustrato TBM que, por la acción de la HPR, se convierte en una forma detectable, por lo que los pocillos que contienen *hk2*, anticuerpo conjugado con biotina y avidina conjugada con la enzima presentan una variación en el color (azul)
6. Se añade una solución de ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto genera un cambio en el color de las muestras (amarillo)

Por último se realiza la lectura espectrofotométrica a 450nm y la determinación de la concentración de cada muestra por comparación de la lectura de la densidad óptica con la curva estándar generada.

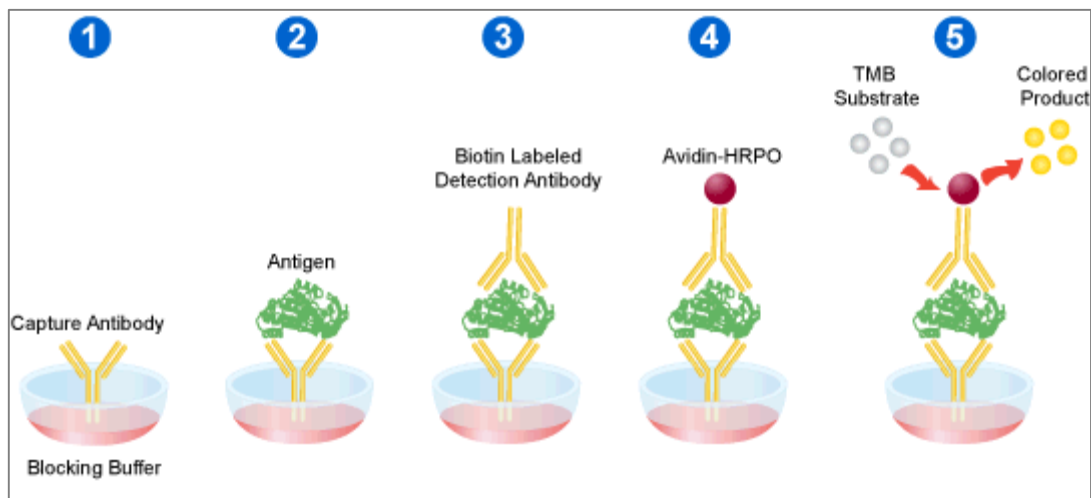


Figura 4-2. Esquema de las uniones antígeno-anticuerpo y del marcaje con HPR del ELISA tipo sándwich utilizado para la valoración de los niveles séricos de *hk2*. Imagen obtenida en: [http://www.leinco.com/sandwich\\_elisa](http://www.leinco.com/sandwich_elisa)

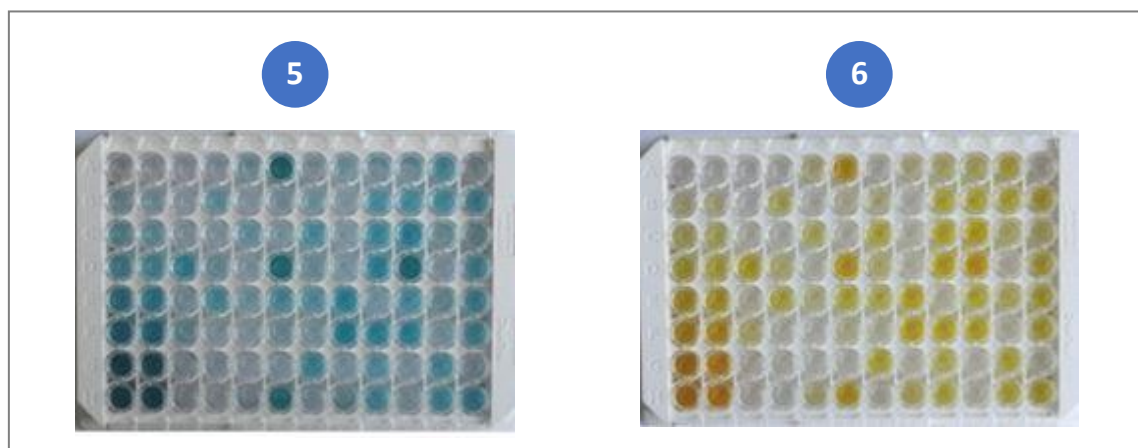


Figura 4-3. Esquema de los cambios colorimétricos generados por la acción de la enzima HPR (5) y por el ácido sulfúrico (6)

#### 4.3.2 ANÁLISIS GENÉTICO DEL POLIMORFISMO rs 198977 C/T DE *KLK2*

En la evaluación de las muestras el personal del laboratorio de genética no conocerá el diagnóstico anatomopatológico, siendo un análisis doble ciego.

Se realizó el análisis genético de 419 pacientes que llevaban a cabo su seguimiento en el Servicio de Urología del Hospital Universitario Severo Ochoa. El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio de Genómica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

##### *EXTRACCIÓN DEL ADN:*

Se extrajo a cada paciente una muestra de 5 ml de sangre venosa periférica que se recolectó en un tubo con EDTA, para evitar la coagulación de la muestra. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su procesamiento.

La extracción del ADN se realizó automáticamente en el sistema EZ1® (*QIAGEN*) que realiza la purificación del ADN mediante partículas magnéticas usando el kit de extracción EZ1® DNA Blood (*QIAGEN*)

El ADN se obtuvo a partir de 350 µl de sangre. Tras un lisado celular, el ADN se une a la sílice que recubre las partículas magnéticas del kit. Mediante un sistema magnético, estas partículas se separan del lisado y tras varios procesos de lavados, se diluye el ADN en un volumen final de 200 µl.

La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría. Se realizó una primera medición a 260 nm para cuantificar el ADN de doble hebra. Se aplicó la fórmula:  $[ADN] = D_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{factor de dilución}$ .

Se realizó una segunda medida a 280 nm para confirmar la pureza del ADN. Considerándose el ADN puro cuando la relación entre las absorbancias  $D_{260}/D_{280}$  está comprendida entre 1,8 y 2.

## AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN DE INTERÉS

La amplificación del fragmento del exón 5 del gen *KLK2* que contiene el polimorfismo rs198977 C/T se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador convencional. Para cada paciente se preparó una mezcla de reacción con 50ng del ADN del paciente, 10pmol de cada cebador (Tabla 4-5), 2.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de dNTPs, 0.25U de Taq ADN polimerasa, 2.5 µl de tampón para PCR y la cantidad necesaria de agua libre de RNAsas hasta completar un volumen final de 25µl. En cada ronda de amplificación se incluyó un control negativo para excluir una posible contaminación de los reactivos. El control contenía todos los reactivos de la mezcla de amplificación excepto el ADN que fue sustituido por agua destilada.

Tabla 4-5. Secuencias de los cebadores y de las sondas utilizadas en la amplificación del fragmento que contiene el polimorfismo rs198977 C/T del gen *KLK2* mediante PCR. Descritas por Robert et al<sup>132</sup>

CEBADOR	SECUENCIA
KLK2	5'-GAG CTG GGA ATT GCT CTC AGT-3'
KLK2 Antisentido	5'-TGC CAG AAC GTG AGG TGG AC -3'

La mezcla de reacción se sometió a un ciclo inicial de 5 minutos a 94°C y posteriormente a 35 ciclos de amplificación en los que cada uno de ellos comprendía: 30 segundos a 95°C para la desnaturalización de la doble hélice, 30 segundos a 64°C para la hibridación y 45 segundos a 72°C para la síntesis de la cadena del ADN.

## COMPROBACIÓN DEL AMPLIFICADO

Tras la amplificación de la región de ADN que contiene el polimorfismo estudiado se valoró la correcta amplificación de cada fragmento y la pureza del amplificado.

Para ello, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2%. Cada gel se preparó con 27ml de agua destilada, 3ml de Tris-Acetato EDTA 10X (TAE), 0.6gr de agarosa y 3ml de Bromuro de Etidio. Como marcador de peso molecular conocido se utilizó el "ADN Molecular WeightMarker VIII" (Roche) que muestra 17 fragmentos de entre 19 y 1114 pb.

Tras la electroforesis, durante 20 minutos a 100V y a temperatura ambiente, los geles se revelaron por exposición a radiación de luz ultravioleta, lo que permitió visualizar los amplificadores como bandas blancas debido al Bromuro de Etidio intercalado entre las bases nitrogenadas del ADN.

La Figura 4-4, muestra el resultado de los análisis; se aprecian las bandas de 323 pb correspondiente al amplificado del gen *KLK2*.

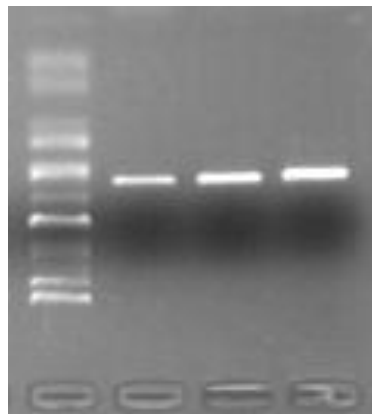


Figura 4-4. Comprobación de los amplificadores. Geles de agarosa al 2% que muestran las bandas de 323 pb del amplificado del gen *KLK2*.

Con este procedimiento se comprobó que los amplificadores eran del tamaño esperado, acorde con los cebadores utilizados y se evaluó la ausencia de contaminación en la reacción de PCR mediante el blanco introducido. Sólo aquellos amplificadores con tamaño correcto y sin contaminación fueron digeridos.

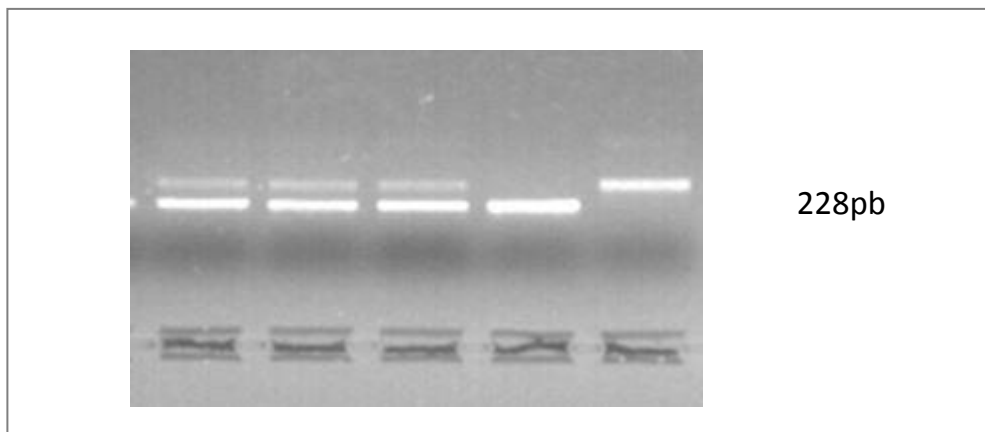
#### **DIGESTIÓN DEL AMPLIFICADO**

Los productos amplificados se sometieron a una digestión enzimática mediante una enzima de restricción. Estas enzimas reconocen secuencias palindrómicas concretas y cortan los enlaces fosfodiéster de la doble hebra de ADN en sitios específicos, obteniendo así fragmentos de tamaños determinados.

La enzima empleada *MspI* reconoce la secuencia CCGG y realiza un corte entre las citosinas. El polimorfismo específico estudiado para dicho gen determina la ausencia de dicho corte cuando existe el cambio C>T. Por ello, el fragmento principal obtenido

tras la digestión mide 228 pares de bases si no está presente la mutación y 323 pares de bases en los pacientes que la presentan, en los cuales la secuencia es CTGG. El proceso de digestión se realizó a 37°C durante 180 minutos. Para ello, se preparó una mezcla de reacción que contenía 2µl de tampón específico para la enzima, 4U de enzima y 5µl de amplificado en un volumen final de 20µl que se completó con agua libre de RNAsas.

Los productos de digestión se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%. La preparación del gel se realizó siguiendo el protocolo anteriormente descrito (en el apartado comprobación del amplificado) modificando la cantidad de agarosa del gel. Se preparó el gel con 0.9gr de agarosa y se sometió a 100V durante 35 minutos, a temperatura ambiente (Figura 4-5)



*Figura 4-5. Gel de agarosa al 3% de los productos de digestión enzimática de los amplificadores del gen KLK2. Se observan los tres posibles genotipos: Heterocigoto CT, bandas de 323 y de 228 pb; Homocigoto mutado TT, banda de 323 pb; Homocigoto CC, banda de 228 pb.*

## **SECUENCIACIÓN**

La comprobación de los genotipos obtenidos por digestión enzimática se realizó por secuenciación. Este proceso se llevó a cabo en los 20 primeros pacientes analizados, para confirmar la validez de la técnica, y en aquellos en los que no se pudo asignar un genotipo mediante digestión enzimática.

La secuenciación consistió en una nueva amplificación del producto amplificado utilizando nucleótidos marcados. Cada muestra se amplificó por duplicado para

secuenciar por separado las dos hebras del ADN. Se preparó una mezcla de 2µl de Premix Big Dye (AppliedBiosystems TM), 2.5µl de producto amplificado, 1µl de cebador (sentido o antisentido, 10µM) y 4.5µl de agua libre de RNAsas. El programa de amplificación para la secuenciación consistió en un primer ciclo de desnaturalización a 96º C durante un minuto y a continuación se realizaron 25 ciclos cada uno de ellos compuesto por: 10 segundos a 96º C, 5 segundos a 50º C y 4 minutos a 60º C. Los productos amplificados se sometieron a varios lavados y se precipitaron con etanol. El ADN purificado se resuspendió en 30ml de formamida, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y 15 minutos a 37º C, y se sometió a una electroforesis capilar en un secuenciador ABI3100® (AppliedBiosystems) La Figura 4-6 y Figura 4-7 muestran imágenes con los resultados de la secuenciación del gen *KLK2* de algunos de los pacientes participantes en el estudio.

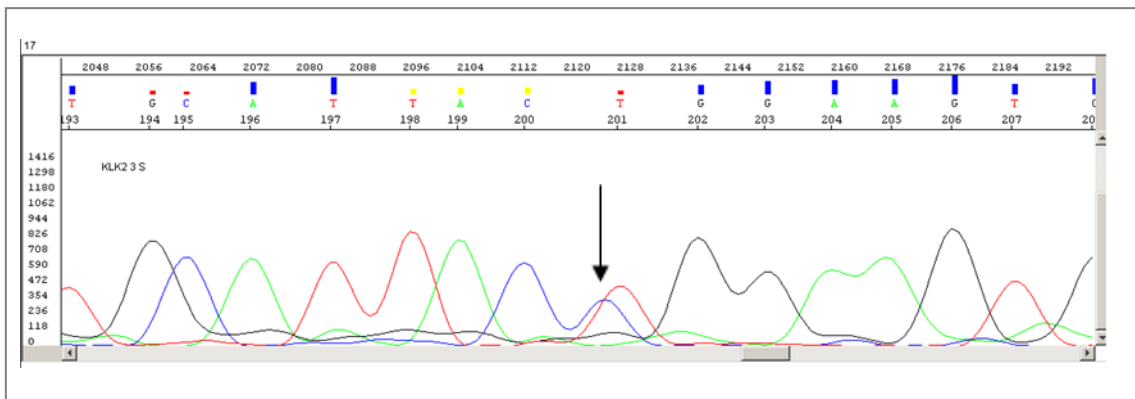


Figura 4-6. Secuencia de paciente heterocigoto CT; la flecha indica la presencia de 2 nucleótidos en una misma posición.

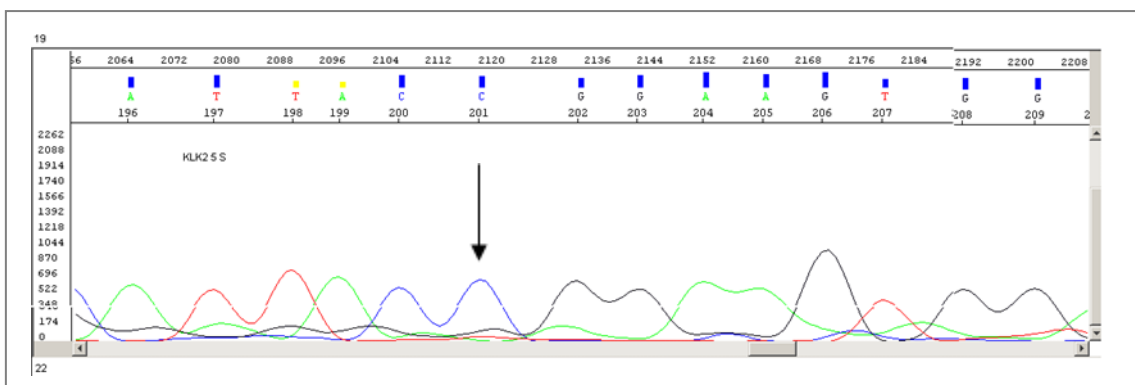


Figura 4-7. Secuencia de paciente homocigoto CC (wt); la flecha indica la presencia de C únicamente.

## 4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cualitativas se presentarán con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumirán en su media, desviación estándar (DE) o la mediana y el rango intercuartil (RIQ) en caso de asimetría. En todos los casos se comprobará la distribución de la variable frente a los modelos teóricos. Se evaluará la asociación entre variables cualitativas con el test de la Chi cuadrado o prueba exacta de Fisher, en el caso de que más de un 25% de los esperados fueran menores de 5 y datos independientes y el test de McNemar en datos emparejados.

Se estratificaron los resultados por las variables independientes en relación a: biopsia positiva, niveles de proteína hk2, polimorfismo rs 198977 C/T, alelos C y T, PSA y formas moleculares del PSA, variables ecográficas prostáticas, variables clínicas y factores de riesgo de los pacientes.

Ajustamos un modelo de regresión logística para evaluar la asociación de las variables de estudio y el resultado de la biopsia. Se expresan los resultados en odds ratios junto a sus IC 95% se construyó la curva ROC del modelo evaluándola con su área bajo la curva (AUC) y su Intervalo de confianza (IC 95%) con las variables significativas con respecto a resultado de biopsia.

Se han usado análisis de curvas de decisión que estiman el beneficio neto para modelos de predicción teniendo en cuenta los verdaderos positivos y restando los falsos positivos. El beneficio neto se calcula según una fórmula que combina verdaderos positivos, falsos positivos y la probabilidad umbral de padecer la enfermedad.

En todos los contrastes de hipótesis se rechaza la hipótesis nula con un error de tipo I o error menor a 0.05. El paquete informático que utilizamos para el análisis fue STATA ver 9.0. y R para las curvas de decisión.

## 5 RESULTADOS

---



La población de estudio está constituida por 419 pacientes que fueron reclutados durante el periodo comprendido entre mayo del año 2012 y mayo del 2014.

## 5.1 DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA COHORTE

### 5.1.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y FACTORES DE RIESGO

El 96,9% de los pacientes es de raza caucásica, siendo la media de edad del total de pacientes de 65,08 años ( $\pm$ DE 7,02) El porcentaje de varones con síntomas del tracto urinario inferior es 54,7% lo que corresponde a 229 varones. El 47,3% presentaba disfunción eréctil y el 45,1% HTA. Tan solo un 15,3% tenía antecedentes familiares de cáncer de próstata (Tabla 5-1)

Tabla 5-1. Características demográficas y factores de riesgo de los 419 pacientes del estudio

Variables	Media $\pm$ DE
Edad (años)	65,08 (7,02)
IMC	27,3 (3,7)
Variables	N (%)
Etnia caucásica	406 (96,9 %)
Historia familiar CP	64 (15,3%)
Presencia STUI	229 (54,7%)
HTA	189 (45,1%)
DM	79 (18,9%)
Disfunción eréctil	198 (47,3%)
Consumo Grasas	132 (31,5%)

(\*DE desviación estándar)

### 5.1.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y ECOGRÁFICAS DE LA GLÁNDULA PROSTÁTICA

Se analizan los datos obtenidos mediante la realización del tacto rectal. Se muestran las frecuencias y distribución de los grados de tacto rectal, así como las características generales de este.

Como se puede observar en la figura 5-1, un 72,3% de los pacientes tenían un tacto rectal grado II lo que corresponde a una próstata de aproximadamente 40 gramos. El 13,8% de los varones tenían un tacto rectal grado III/IV, el 13,1% grado II/IV y tan solo el 0,5% grado I/IV (Figura 5-1)

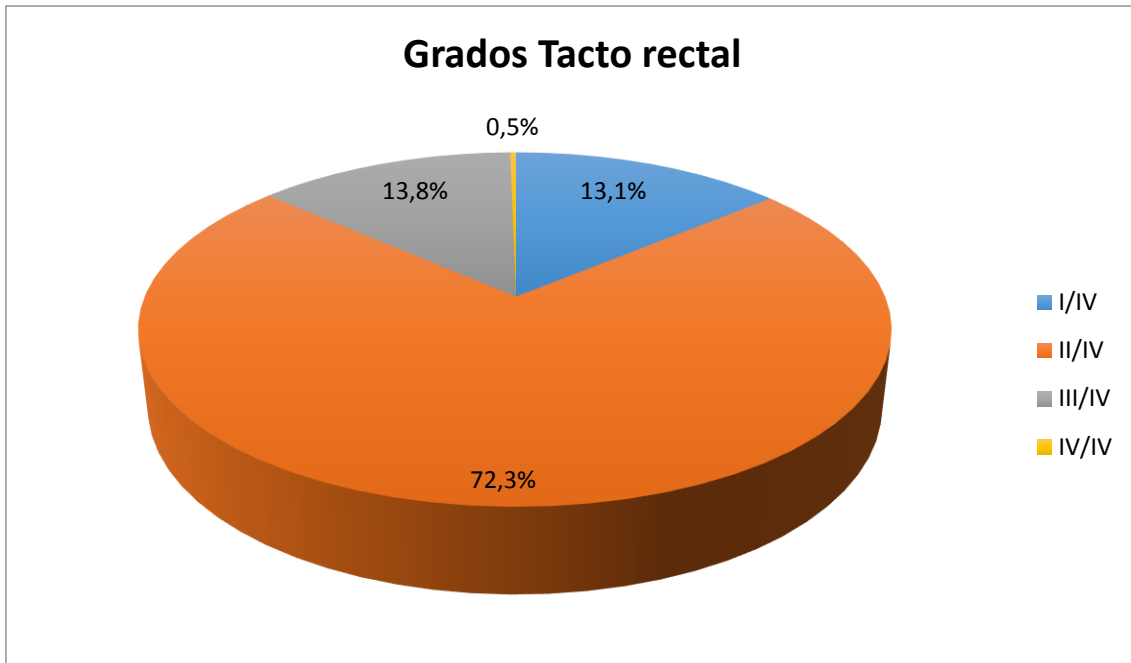


Figura 5-1. Grados del tacto rectal

En la siguiente tabla se detallan las características morfológicas de la próstata según el tacto rectal. La mayoría de los varones tenían una próstata adenomatosa (68%), y/o fibroelástica (78%) en el tacto rectal. Tan solo un 4,8% de los pacientes presentaban borramiento del surco prostático en la exploración. Induración la presentaban un 24,8% y asimetría de lóbulos prostáticos un 12,9% (Tabla 5-2)

En el 20,3% de los casos se palpó un nódulo en la exploración mediante tacto rectal.

Tabla 5-2. Características del tacto rectal de 419 pacientes

<b>Variables Tacto rectal</b>	<b>N (%)</b>
<b>Nódulo palpable</b>	85 (20,3)
<b>Induración</b>	104 (24,8)
<b>Asimetría</b>	54(12,9)
<b>Borramiento</b>	20 (4,8)
<b>Adenomatosa</b>	285 (68)
<b>Fibroelástica</b>	326 (77,8)

A continuación se exponen los resultados obtenidos en la exploración de la próstata mediante ecografía transrectal (presencia de nódulo sospechoso y volumen prostático) La media de volumen prostático es de 61,1 cc, y se observa la presencia de nódulo sospechoso en la ecografía en un 27,2% de los pacientes (Tabla 5-3)

Tabla 5-3. Distribución de frecuencias de nódulo sospechoso en la ecografía, y media  $\pm$  desviación estándar de los hallazgos ecográficos de los 419 pacientes

<b>Variables ecográficas</b>	<b>N(%)</b>
<b>Presencia Nódulo sospechoso</b>	114 (27,2%)
<b>Variables ecográficas</b>	<b>Media <math>\pm</math> DE</b>
<b>Volumen</b>	61,1 (30,48)
<b>Diámetro longitudinal</b>	5,1 (0,98)
<b>Diámetro transversal</b>	5,3 (0,8)
<b>Diámetro anteroposterior</b>	4,0 (0,97)

(DE desviación estándar)

### 5.1.3 CARACTERÍSTICAS DE LA BIOPSIA TRANSRECTAL

En el 93,1 % de los pacientes se realizó biopsia extendida (Tabla 5-4)

Tabla 5-4. Distribución de los tipos de biopsia realizada en los 419 pacientes

Tipo Biopsia	N (%)
Extendida	390 (93,1)
No Extendida	29 (6,9)

A continuación se muestra la distribución de pacientes según el número de biopsias al que se habían sometido, incluyendo la biopsia realizada en el momento del estudio.

Como se puede observar de la tabla 5-5 en el 67,1 % de los pacientes se realizó una única biopsia. En un 20,5% de los pacientes la biopsia que se realizaba era la segunda, y en un 8,8% la tercera biopsia. El mayor número de biopsias ( $\geq 4$ ) se corresponde con un porcentaje menor de pacientes (3,6%) (Tabla 5-5)

Tabla 5-5. Distribución de los 419 pacientes según el nº de biopsia al que habían sido sometidos

Nº de Biopsias	N (%)
1	281(67,1)
2	86(20,5)
3	37(8,8)
$\geq 4$	15(3,6)

### 5.1.4 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS VALORES DE LAS CALICREINAS GLANDULARES HUMANAS

La media de PSA total de los pacientes sometidos a biopsia ha sido de 16,4 ng/ml. El ratio PSA libre/total 15,9% ng/ml y la densidad de PSA media fue de 0,27. El valor medio de la proteína glandular humana 2 es de 0,07 ng/ml.

Se han calculado las medias de las relaciones entre la hk2 y las formas moleculares del PSA. La media del cociente hk2/PSA total es 1,07%. La media de

hK2/PSA libre es de 8,2% y del cociente hK2xPSA total/libre es de 0,61%, (Tabla 5-6) En la Tabla 5-7 se describen las medias en función del resultado de la biopsia y del genotipo de los pacientes. Se observa que la media de hK2 de los pacientes con cáncer de próstata es mayor (0,08 ng/ml) que la de los pacientes con biopsia negativa (0,06 ng/ml)

Tabla 5-6. Descripción de las formas moleculares del PSA y la proteína hK2 en los 419 pacientes.

hK2, PSA y formas moleculares	media ± DE
PSA total ng/ml	16,4 (99,08)
PSA libre ng/ml	1,97 (9,5)
PSA ligado ng/ml	6,5(9,06)
% PSA libre/total	15,9(8,64)
Densidad PSA ng/ml	0,27(0,87)
hK2 ng/ml	0,07(0,13)
Cociente hK2/PSA total %	1,07(1,96)
Cociente hK2/PSA libre %	8,2(16,67)
Cociente hK2xPSA total/libre %	0,61(1,47)

Tabla 5-7. Descripción de las medias de las formas moleculares del PSA y de la hK2 en función del resultado de la biopsia y de los genotipos en los 419 pacientes. (Media ± DE)

	Media Biopsia +	Media Biopsia -	Media ASAP/PINAG	Media C/C	Media C/T	Media T/T
PSA tot ng/ml	14,46 ±13,80	8,67 ±5,93	8,48 ±5,99	10,33 ±10,59	10,40 ±8,38	8,98 ±6,19
PSA lib ng/ml	1,55 ±1,72	1,41 ±1,21	1,39 ±0,94	1,32 ±1,12	1,58 ±1,48	1,41 ±1,45
PSA lig ng/ml	8,91 ±8,66	4,72 ±3,73	5,13 ±3,74	6,14 ±6,53	6,03 ±5,56	4,87 ±3,74
PSA lib/tot %	12,12 ±7,34	16,91 ±7,61	18,07 ±7,95	15,16 ±8,01	16,31 ±7,76	16,14 ±7,95
hK2/PSA tot %	0,86 ±1,76	1,01 ±1,37	1,55 ±3,20	1,05 ±1,55	1,16 ±2,46	1,01 ±1,43
hK2/PSA lib %	9,67 ±22,87	7,12 ±10,87	8,38 ±17,20	8,65 ±14,60	8,41 ±20,25	7,09 ±9,66
hK2xPSA tot/PSA lib	0,97 ±2,50	0,46 ±0,63	0,54 ±1,08	0,55 ±0,79	0,74 ±2,09	0,42 ±0,55
hK2 en suero ng/ml	0,08 ±0,19	0,06 ±0,06	0,09 ±0,18	0,06 ±0,06	0,09 ±0,19	0,05 ±0,05

### 5.1.5 DISTRIBUCIÓN DEL POLIMORFISMO EN LA POBLACIÓN A ESTUDIO

Se analizó la distribución del polimorfismo CT rs 198977 del *gen KLK2* en la población de varones a estudio. Se analizó la distribución genotípica así como la frecuencia alélica de C y T por separado (Tabla 5-8)

Tabla 5-8. Distribución de frecuencias de los genotipos y alelos en los 419 pacientes biopsiados. Distribución de los alelos según estén o no presentes en los 419 pacientes biopsiados

Polimorfismos rs 198977	N (%)
CC	185(44,2)
CT	179(42,7 )
TT	55(13,1)
Alelos	N (%)
C	365(87,1)
T	234(55,8 )
	N (%)
Ausencia T	184(44,0 )
Presencia T	233(55,8)
Ausencia C	54(13,0)
Presencia C	364(86,9)

*Los alelos están en equilibrio (Hardy Weinberg) HWE ( $\chi^2=0,78$ ,  $p=0,37$ ); es decir; la población permanece en equilibrio.*

### 5.1.6 CARACTERÍSTICAS DE LOS TUMORES

En 121 (28,8%) casos la biopsia resultó diagnóstica de cáncer de próstata, en 73 ocasiones (17,4%) fue ASAP o PINAG, y en 221 (52,7%) negativa para malignidad (Figura 5-2).

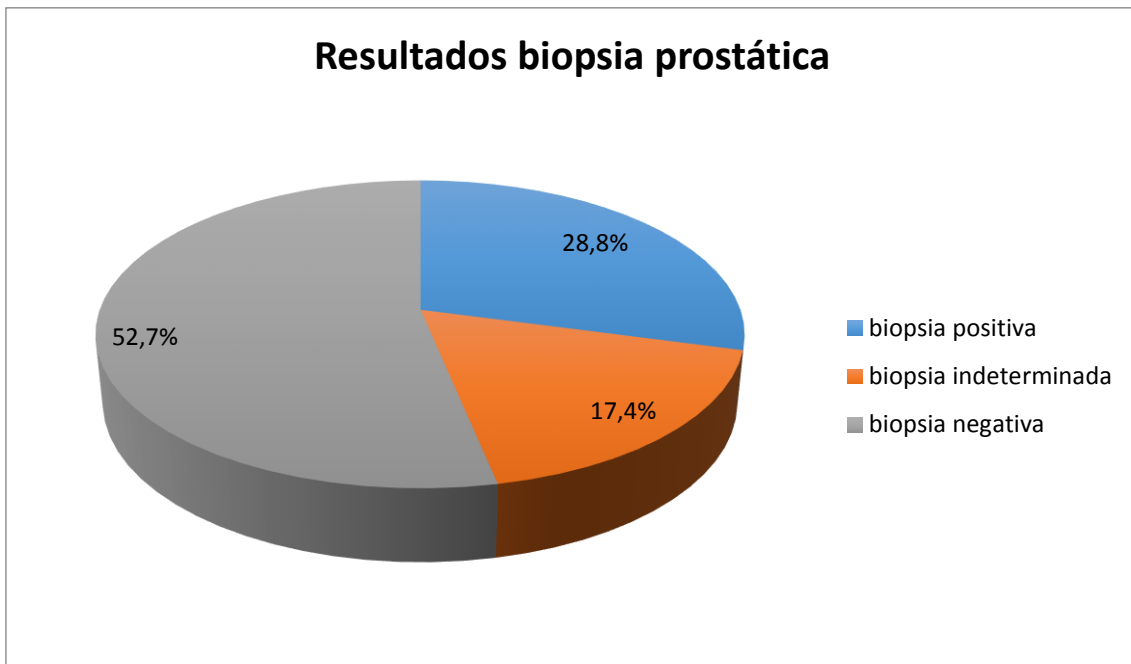


Figura 5-2. Resultado de la biopsia de próstata en los 419 varones del estudio.

#### GLEASON DE LA BIOPSIA

Con respecto al grado de Gleason que se obtiene en la biopsia la mayoría de los tumores ( 53,7%) tienen un Gleason de 6 (3+3) 37 pacientes (30,5%) tienen un Gleason de 7, correspondiéndose 26 de estos a un Gleason 3+4, y 10 a un Gleason de 4+3. En el resto de grados el número de pacientes es menor de 10 (Tabla 5-9).

Tabla 5-9. Distribución de los 121 pacientes con cáncer de próstata según el grado de Gleason

Grados Gleason	N (%)
<b>5 (3+2)</b>	1 (0,8)
<b>6 (3+3)</b>	65 (53,7)
<b>7 (3+4)</b>	26 (21,4)
<b>7 (4+3)</b>	10 (8,2)
<b>8 (4+4)</b>	9 (7,4)
<b>9 (4+5)</b>	9 (7,4)
<b>10 (5+5)</b>	1 (0,8)

Los pacientes se aunaron en grupos de Gleason según el riesgo. La mayoría (N 65) son de bajo riesgo teniendo un Gleason menor o igual a 6. Gleason de 7 se obtiene en un total de 36 pacientes, y el Gleason mayor o igual a 8 corresponde a 20 pacientes (Figura 5-3)

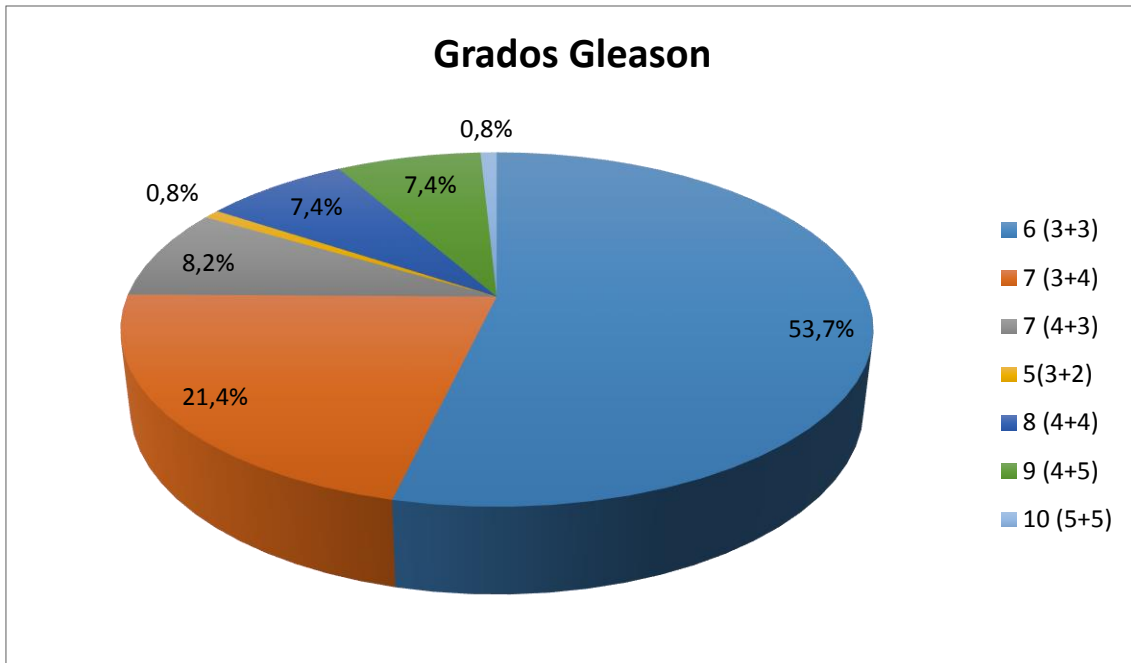


Figura 5-3: distribución de los grados de Gleason en los 121 pacientes con cáncer de próstata.

### DIFERENCIACIÓN CELULAR

Los pacientes se agruparon en función del riesgo que se estimaba teniendo en cuenta la diferenciación celular del tumor en la anatomía patológica. El 42% de los pacientes tenían un tumor moderadamente diferenciado, el 31% bien diferenciado y el 27% pobremente diferenciado (Figura 5-4).

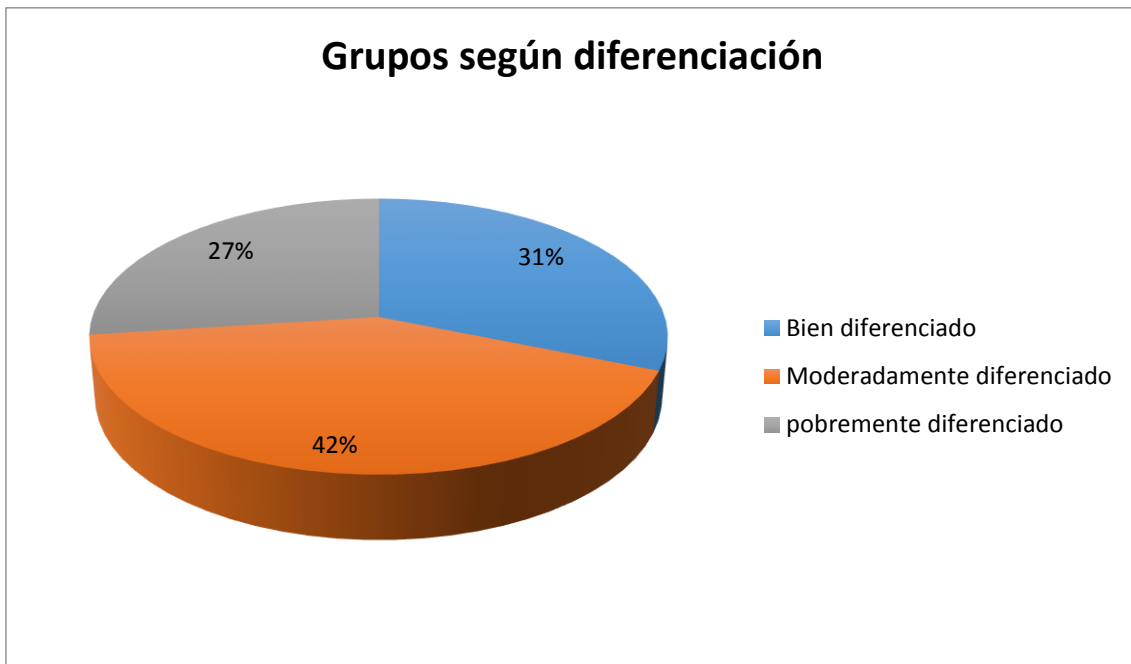


Figura 5-4: grupos de pacientes según la diferenciación celular del tumor de próstata.

### **AFECTACIÓN TUMORAL**

Se analizan los porcentajes en los que el tumor invade los cilindros prostáticos y el número de cilindros afectados por tumor (Tabla 5-10).

En un 77,7% de los casos el tumor invade más del 11 % de los cilindros afectados, siendo un porcentaje pequeño de los pacientes los que tienen una afectación igual o menor al 5 % de todos los cilindros de la muestra.

El 8,3% de los pacientes tenían un 6-10% de afectación tumoral en los cilindros prostáticos.

Tabla 5-10. Afectación tumoral de los cilindros de los 121 pacientes con biopsia positiva

Afectación tumoral	N (%)
≤ 5%	17 (14 )
6-10%	10 (8,3)
>11%	94 (77,7)

Se lleva a cabo el análisis del número de cilindros afectos por tumor. En este caso los grupos son muy homogéneos en cuanto a número de pacientes de cada

uno. La distribución es muy similar siendo mayor el número de pacientes que tienen igual o más de 7 cilindros afectados (37,2%) El 30,6% de los pacientes tienen afectados de 3 a 6 cilindros y el 31,4%  $\leq$  a 2 cilindros afectados (Tabla 5-11).

Tabla 5-11. Distribución por grupos del nº de cilindros afectados en la biopsia por tumor en los 121 pacientes con biopsia positiva

Cilindros afectados	N (%)
$\leq 2$	38 (31,4)
3-6	37 (30,6)
$\geq 7$	46 (37,2)

### ESTADIO CLÍNICO

Respecto al estadio clínico del tumor de próstata el 52,1% de los pacientes tenían un estadio órgano confinado T1c-T2a. El 35,5% de los varones se correspondían con un estadio T2b-T2c y tan solo el 12,4% de los pacientes tenían un tumor localmente avanzado (Tabla 5-12).

Tabla 5-12. Distribución de los tumores en función del estadio clínico en los 121 pacientes con biopsia positiva

Estadio clínico	N (%)
T1c	47 (11,2)
T2a	16 (3,8)
T2b	17 (4,1)
T2c	26 (6,2)
T3a	1 (1,2)
T3b	4 (1,0)
T4	6(1,4)
<b>Órgano confinados</b>	<b>N (%)</b>
T1c-T2a	63 (52,1)
T2b-T2c	43 (35,5)
<b>Localmente avanzados</b>	<b>N (%)</b>
$\geq T3a$	15 (12,4)

Según la afectación ganglionar tan solo 11 (9%) pacientes tenían ganglios positivos, seguidos de un 24,7% que se desconoce si los tienen o no ya que por estadiaje no precisaban de la realización de un TAC (Tabla 5-13).

Con respecto a la presencia de metástasis el resultado es muy similar al de la afectación ganglionar. Tan solo 8 pacientes (6,6%) tenían metástasis (Tabla 5-13).

*Tabla 5-13. Distribución de los 121 pacientes con cáncer de próstata en función de la afectación ganglionar y de la presencia de metástasis*

Afectación ganglionar	N (%)
Nx	30 (24,7)
N0	81 (66,9)
N1	11 (9,0)
Presencia de metástasis	N (%)
Mx	30 (24,7)
Mo	84 (69,4)
M1	8 (6,6)

### **GRUPOS DE RIESGO**

En la Tabla 5-14 se muestra la distribución de pacientes según la clasificación por grupos de riesgo de D'Amico: el 35,5% corresponden a tumores de próstata de bajo riesgo, el 34,7% riesgo intermedio y el 29,7% riesgo alto.

*Tabla 5-14. Distribución de los grados de riesgo según D'Amico en los 121 pacientes con cáncer de próstata.*

Clasificación D'Amico	N (%)
Bajo	43 (35,53)
Intermedio	42 (34,7)
Alto	36 (29,7)

### **5.1.7 TIPOS DE TRATAMIENTO**

En la Figura 5-5 se muestra la distribución de los tratamientos aplicados al grupo de pacientes. La radioterapia externa asociada a hormonoterapia y la prostatectomía radical laparoscópica fueron los procedimientos realizados con

más frecuencia con un 33% y un 30% respectivamente. El 10% de los pacientes recibieron radioterapia, otro 10% se sometieron a protocolos de vigilancia activa, al 12% se les dio tratamiento quimioterápico paliativo y tan solo el 5% se sometió a una actitud expectante de vigilancia (wait and see).

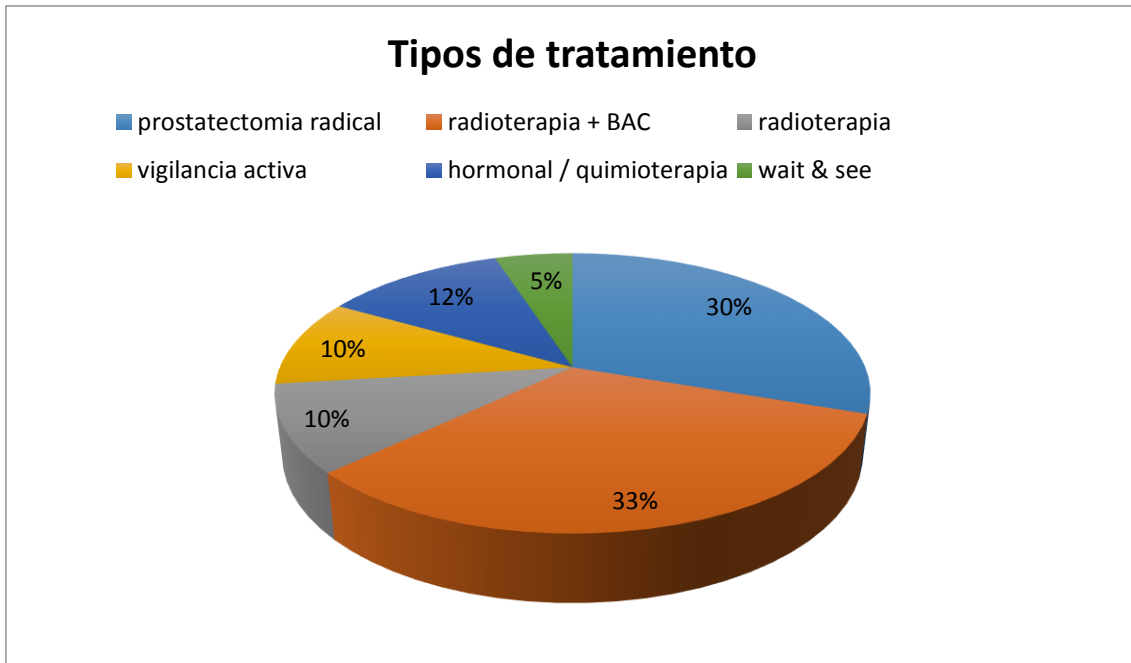


Figura 5-5. Distribución de los tratamientos aplicados a los 121 pacientes con neoplasia de próstata

### **PROSTATECTOMIA RADICAL LAPAROSCÓPICA**

En los 35 pacientes que se trataron con cirugía radical se analizaron distintas variables pronósticas para el cáncer de próstata. Se analizó el Gleason post operatorio, la invasión linfovascular y la existencia de márgenes quirúrgicos positivos.

Tabla 5-15. Distribución de los 35 pacientes intervenidos según el grado de Gleason de la pieza quirúrgica.

Gleason quirúrgico	N (%)
Gleason $\leq 6$	14 (40)
Gleason =7	19 (54,2)
Gleason $\geq 8$	2 (5,7)

La mayoría de los pacientes operados tienen un Gleason de 7 (54,2%), seguidos de un 40 % que tienen un Gleason de 6 o menor. Tan solo el 5,7% tenían un Gleason mayor o igual a 8 (Tabla 5-15).

Con respecto a los márgenes quirúrgicos afectos los pacientes operados mostraban la siguiente distribución: un 34,2 % de los pacientes tenían afectación de los márgenes quirúrgicos mientras que un 65,71% no tenían.

Asimismo se analizó el estadio anatomopatológico de la pieza de prostatectomía como se muestra en la figura siguiente. La mayoría de los pacientes operados (N 17, 48,5%) presentaron un estadio pT2c, seguido en frecuencia por el estadio pT2a con un 22% de los pacientes. El 19% de los varones intervenidos tenían un estadio pT3a, mientras que tan solo un 6% tenían un pT2b (Figura 5-6).

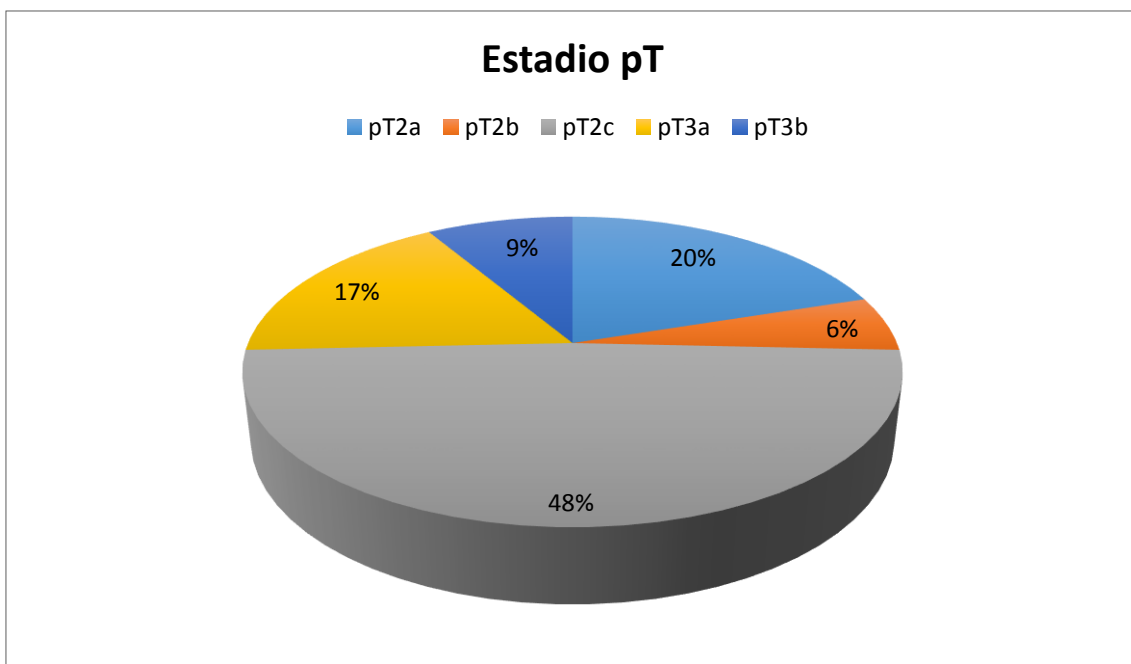


Figura 5-6. Distribución del estadio clínico de la pieza quirúrgica de los 35 pacientes operados

## 5.2 ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO CON EL RESULTADO DE LA BIOPSIA DE PRÓSTATA

Se relacionaron las variables clínico-patológicas, genéticas y calicreinas objeto del estudio, con el resultado obtenido de la biopsia transrectal de próstata. Los posibles resultados de ésta son: biopsia positiva, ASAP/PINAG y biopsia negativa.

### 5.2.1 ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LAS VARIABLES CLINICO-PATOLÓGICAS CON EL RESULTADO DE LA BIOPSIA

Se ha analizado la relación de las características basales de los pacientes y los datos ecográficos y clínicos de la próstata con el resultado de la biopsia.

#### 5.2.1.1 Antecedentes personales y factores de riesgo

##### a. Edad

La edad superior a 70 años se relacionó con el diagnóstico de cáncer de próstata en un 44,3% de los pacientes, siendo esta relación estadísticamente significativa  $p < 0,001$ . En cambio dentro del grupo de pacientes con menos de 60 años, el 69,1 % tenían un resultado negativo en la biopsia (Tabla 5-16).

##### b. Etnia

Los pacientes se clasificaron en 4 grupos según la raza: negra, latina, caucásica y otros.

No existe asociación significativa entre la etnia de los pacientes y el resultado de la biopsia de próstata ( $p = 0,44$ ) La mayoría de los pacientes del estudio (N 402, 95,9%) eran de raza caucásica por lo que no se puede establecer relación entre las otras etnias y el resultado de la biopsia (Tabla 5-16).

c. Historia familiar de cáncer de próstata

No existe una relación significativa entre la presencia de antecedentes familiares de cáncer de próstata y el resultado de la biopsia. De los 121 pacientes que tenían biopsia positiva tan solo 18 (14,8%) presentaban historia de cáncer de próstata en su familia (Tabla 5-16).

d. Índice de masa muscular

En la relación entre el índice de masa muscular y el resultado de la biopsia se observó que era más frecuente tener un IMC de 25-30 (53,4%) que un IMC menor de 25 (39,7%) o IMC mayor de 30 (6,8%) si en el resultado de la biopsia se obtenía un ASAP/PINAG. En los pacientes con biopsias positivas para cáncer de próstata era menos frecuente tener un IMC mayor de 30 (21,4%) que tenerlo entre 25-30 (38,8%), o menor de 25 (39,6%). Los pacientes con biopsia negativa tenían más frecuentemente (41,6%) un IMC de 25-30, mientras que presentaban un IMC menor de 25 en un 34,8% de los casos y un IMC mayor de 30 en un 23 % de las ocasiones; ( $p = 0,014$ ) (Tabla 5-16).

e. Consumo abundante de grasas en la dieta

No se ha encontrado asociación estadísticamente significativa entre el consumo abundante de grasas y el resultado de la biopsia ( $p = 0,90$ ). Un 31,4 % de los pacientes con biopsia positiva tenían un consumo abundante de grasas frente al 68,5% que no lo tenían.

En los pacientes con biopsia negativa un 67,4% no tenían un consumo elevado de grasas frente al 31,6% que si lo presentaban (Tabla 5-16).

f. Diabetes mellitus

La asociación entre tener diabetes y el resultado de la biopsia no es estadísticamente significativa ( $p = 0,98$ ). De los pacientes con biopsia positiva

tan solo 22 varones (18,1 %) tenían diabetes mellitus frente al 81,8% que no la padecían. De todos los pacientes con diabetes mellitus el 53,2% tenían biopsias negativas para malignidad (Tabla 5-16).

*g. HTA*

Al estudiar la relación entre padecer HTA y el resultado de la biopsia no se ha hallado significación estadística ( $p= 0,46$ ) De los pacientes que presentaban HTA la mayoría eran varones con biopsia negativa (50,5%) (Tabla 5-16).

*h. Presencia de síntomas del tracto urinario inferior.*

Se analizó la relación existente entre los síntomas tanto de llenado como de vaciado del tracto urinario inferior y el resultado de la biopsia de próstata no encontrando significación estadística ( $p=0,69$ ). De todos los pacientes que presentaban síntomas del tracto urinario inferior un 51,8% tenían una biopsia negativa para malignidad, frente a un 32,3% de varones con biopsia positiva para cáncer (Tabla 5-16).

*i. Disfunción eréctil*

Con respecto a la asociación entre la presencia de disfunción eréctil y el resultado de la biopsia se encontró relación estadísticamente significativa ( $p= 0,026$ ). En los pacientes con biopsia positiva tener disfunción eréctil fue más frecuente (54,5%) que no tenerla (45,5%) Asimismo un 53,4% de los pacientes con ASAP/PINAG en la biopsia presentaban disfunción eréctil frente al 46,5% que no la padecían. En los pacientes con biopsia negativa fue más frecuente no tener disfunción (58,8%) que padecerla (40,7%) (Tabla 5-16).

Tabla 5-16. Distribución del resultado de la biopsia de próstata en relación a los antecedentes personales y factores de riesgo de los pacientes, N (%)

Variables		Biopsia +	ASAP/PINAG	Biopsia -	p
<b>Edad (años)</b>	<60	14 (17,3)	11 (13,6)	56 (69,1)	<b>&lt;0,001</b>
	60-70	64 (27,0)	45 (19,0)	128(54,0)	
	>70	43 (44,3)	17 (17,5)	37 (38,1)	
<b>Etnia</b>	Caucásica	118(29,4)	68 (16,9)	216(53,7)	0,443
	Negro	0	0	1 (100,0)	
	Latino	2 (50,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	
	otras	1 (50,0)	1 (50,0)	0	
<b>Historia familiar CP</b>	SI	18 (28,1)	11 (17,2)	35 (54,7)	0,969
	NO	103(29,3)	62 (17,7)	186(53,0)	
<b>IMC</b>	<25	48 (31,2)	29 (18,8)	77 (50,0)	<b>0,014</b>
	25-30	47 (26,4)	39 (21,9)	92 (51,7)	
	>30	26 (31,7)	5 (6,1)	51 (62,2)	
<b>GRASAS</b>	SI	38 (29,5)	21 (16,3)	70 (54,3)	0,905
	NO	83 (29,3)	51 (18,0)	149(52,7)	
<b>DM</b>	SI	22 (28,6)	14 (18,2)	41 (53,2)	0,985
	NO	99 (29,4)	59 (17,5)	179(53,1)	
<b>HTA</b>	SI	60 (32,3)	32 (17,2)	94 (50,5)	0,467
	NO	61 (26,8)	41 (18)	126(55,3)	
<b>STUI</b>	SI	66 (29,2)	43 (19,0)	117(51,8)	0,695
	NO	55 (29,3)	30 (16,0)	103(54,8)	
<b>DE</b>	SI	66 (33,8)	39 (20,0)	90 (46,2)	<b>0,026</b>
	NO	55 (25,1)	34 (15,5)	130(59,4)	

### 5.2.1.2 Características ecográficas y clínicas de la glándula prostática

Se ha analizado la relación entre las características de la glándula prostática obtenidas mediante la exploración clínica con el tacto rectal y mediante ecografía y con el resultado de la biopsia.

#### a. Variables clínicas del tacto rectal

Se obtuvieron mediante la exploración clínica las siguientes variables: tamaño, nódulo palpable, asimetría y la consistencia donde se especifican induración, borramiento, fibroelástica y adenomatosa.

La relación de todas estas variables con el resultado de la biopsia de próstata ha sido estadísticamente significativa (Tabla 5-17).

Con respecto al tacto rectal, los pacientes con biopsia positiva tienen con más frecuencia (80,1%) un volumen II/IV, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,008$ ).

La presencia de un nódulo palpable en el tacto es mucho más frecuente en pacientes con una biopsia positiva (69,9%) que en las ASAP/PINAG (12%) y biopsias negativas (18,1%); ( $p < 0,001$ ).

El estudio de la relación las diferentes posibilidades en cuanto a la consistencia del tacto rectal con el resultado de la biopsia muestra una asociación para todas ellas estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Los pacientes con induración, asimetría y borramiento en la consistencia del tacto rectal mostraron una mayor frecuencia de biopsia positiva (59,4%, 63,5% y 63,5% respectivamente), que la ausencia de estas.

La consistencia adenomatosa se asoció significativamente con las biopsias negativas (63,4%;  $p < 0,001$ ).

#### *b. Variables obtenidas mediante ecografía transrectal*

Las variables obtenidas mediante ecografía transrectal fueron el volumen glandular y la presencia o no de nódulo sospechoso.

La relación de ambas con el resultado de la biopsia fue estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Con respecto al volumen de la próstata los pacientes con una glándula  $< 38,3$  cc tenían con mayor frecuencia (48,1%) un resultado positivo en la biopsia, frente a un 14,4% que tenían ASAP/PINAG o un 37,5% que tenían una biopsia negativa. Asimismo la presencia de un nódulo sospechoso en la ecografía es significativamente más frecuente (63,1%) en los pacientes con biopsias positivas que en los ASAP/PINAG (15,3%) y biopsias negativas (21,6%) (Tabla 5-17).

Tabla 5-17. Distribución del resultado de la biopsia de próstata en función de las características ecográficas y clínicas de la glándula prostática de los 419 pacientes, N (%)

Variables		Biopsia +	ASAP/PINAG	Biopsia -	p
<b>TR</b>	I/IV	18(31,0)	13 (22,4)	27 (46,6)	<b>0,008</b>
	II/IV	97 (32,3)	51 (17,0)	152(50,7)	
	III/IV	6 (11,1)	8 (14,8)	40 (74,1)	
	IV/IV	0	0	2 (100,0)	
<b>Induración</b>	SI	60 (59,4)	12 (11,9)	29 (28,7)	<b>&lt;0,001</b>
	NO	61 (19,5)	60 (19,2)	192(61,3)	
<b>Asimetría</b>	SI	33 (63,5)	6 (11,5)	13(25,0)	<b>&lt;0,001</b>
	NO	88 (24,3)	66 (18,2)	208(57,5)	
<b>Borramiento</b>	SI	17 (89,5)	1 (5,3)	1 (5,3)	<b>&lt;0,001</b>
	NO	104(26,3)	72(18,0)	220(55,7)	
<b>Adenomatosa</b>	SI	50 (17,6)	54 (19,0)	180(63,4)	<b>&lt;0,001</b>
	NO	71 (54,6)	18 (13,8)	41(31,5)	
<b>Fibroelástica</b>	SI	65 (20,0)	39 (20,0)	90 (46,2)	<b>&lt;0,001</b>
	NO	56 (62,9)	8 (9,0)	25 (28,1)	
<b>Volumen (cc)</b>	<40	50 (48,1)	15 (14,4)	39 (37,5)	<b>&lt;0,001</b>
	40-55	40 (38,8)	15 (14,6)	48 (46,6)	
	56-75	23 (22,1)	25 (24,0)	56 (53,8)	
	>75	8 (7,7)	18 (17,3)	78 (75,0)	
<b>Nódulo sospechoso</b>	SI	70 (63,1)	17 (15,3)	24 (21,6)	<b>&lt;0,001</b>
	NO	51(16,8)	56 (18,4)	197(64,8)	

## 5.2.2 ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LAS CALICREINAS CON EL RESULTADO DE LA BIOPSIA

### 5.2.2.1 Formas moleculares del PSA

#### a. PSA total

Se ha analizado la relación existente entre grupos de PSA total creados teniendo en cuenta el rango de 4-10 ng/dl, y los cuartiles obtenidos en el análisis estadístico del estudio.

Se puede observar que existe una relación estadísticamente significativa entre los grupos de PSA total y el resultado de la biopsia ( $p < 0,001$ ). En el grupo de PSA > 10 ng/dl así como en el grupo percentil PSA total >11,9 ng/dl es más frecuente obtener un resultado positivo en la biopsia (43,5% y 47,6%

respectivamente) que obtener ASAP/PINAG o biopsia negativa para tumor (Tabla 5-18).

*b. PSA libre*

No existe asociación significativa entre los grupos establecidos de PSA libre y el resultado de la biopsia ( $p= 0,78$ ) (Tabla 5-18).

*c. Índice PSA LIBRE/PSA TOTAL*

Se observó relación estadísticamente significativa entre el índice libre/total y el resultado de la biopsia ( $p <0,001$ ) (Tabla 5-18).

Establecemos varios grupos: uno de ellos según los cuartiles obtenidos en el análisis y otro según el punto de corte usado en la práctica clínica habitual de 20%.

En ambos se obtienen dentro del grupo de biopsia positiva los ratios más bajos con significación estadística. En el grupo del cuartil menor de 9,67% un 55,8% de los pacientes obtuvieron biopsia positiva. Cuando se analiza en función del corte usado en la clínica habitual 20% (que coincide con el cuartil superior del estudio), un 33,1% tuvieron un resultado positivo.

*d. PSA COMPLEX*

Al realizar el análisis estadístico se observa que la relación existente entre el PSA complex y el resultado de la biopsia de próstata es significativa. En el grupo del cuartil PSA complex mayor de 6,89 ng/dl era significativamente más frecuente obtener biopsia positiva (51,9%) que un ASAP/PINAG (14,4%) o biopsia negativa 33,7%. Asimismo el grupo con el cuartil inferior tenía mayoritariamente (62,7%) resultados negativos (Tabla 5-18).

e. DENSIDAD DEL PSA

La relación entre la densidad del PSA y el resultado de la biopsia de próstata es estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) En el grupo densidad mayor de 0,23 era significativamente más frecuente tener biopsia con cáncer de próstata (57,8%) que tener ASAP/PINAG (6,4%) o ausencia de malignidad (35,8%) (Tabla 5-18).

Tabla 5-18. Distribución de frecuencias de los resultados de la biopsia de próstata en relación con las formas moleculares del PSA (ng/dl) de los 419 pacientes, N (%)

Variables		Biopsia +	ASAP/PINAG	Biopsia -	p
<b>PSA total</b>	<4	8 (20,0)	6 (15,0)	26 (65,0)	<b>&lt;0,001</b>
	4-10	53 (22,4)	48 (20,3)	136(57,4)	
	>10	60 (43,5)	19 (13,8)	59 (42,8)	
<b>Cuartiles PSA total</b>	<5,2	20 (19,6)	23 (22,5)	59 (57,8)	<b>&lt;0,001</b>
	5,2-7,	19 (18,3)	18 (17,3)	67 (64,4)	
	7,6-11,9	32 (30,8)	18 (17,3)	54 (51,9)	
	>11,9	50 (47,6)	14 (13,3)	41 (39,0)	
<b>Cuartiles PSA libre</b>	<0,7	33 (32,4)	16 (15,7)	53 (52)	0,787
	0,7-1,11	28 (26,7)	18 (17,1)	59 (56,2)	
	1,12-1,74	24 (23,8)	20 (19,8)	57 (56,4)	
	>1,75	34 (32,4)	19 (18,1)	52 (49,5)	
<b>PSA libre /total %</b>	≤20	102(33,1)	47 (15,3)	159(51,6)	<b>0,001</b>
	>20	17(16,2)	26 (24,8)	62 (59,0)	
<b>Cuartiles PSA libre /total %</b>	<9,67	58(55,8)	10 (9,6)	36 (34,6)	<b>&lt;0,001</b>
	9,68-14,5	31 (30,4)	17 (16,7)	54 (52,9)	
	14,6-20,2	13 (12,5)	21 (20,2)	70 (67,3)	
	>20,3	17 (16,5)	25 (24,3)	61 (59,2)	
<b>Cuartiles PSA complex</b>	<2,93	17 (16,7)	21 (20,6)	64 (62,7)	<b>&lt;0,001</b>
	2,93-4,16	20 (19,2)	14 (13,5)	70 (67,3)	
	4,17-6,88	28 (27,2)	23 (22,3)	52 (50,5)	
	>6,89	54 (51,9)	15 (14,4)	35 (33,7)	
<b>Cuartiles densidad PSA</b>	<0,09	8 (8,1)	20 (20,2)	71 (71,7)	<b>&lt;0,001</b>
	0,1-0,14	19 (18,3)	22 (21,2)	63 (60,6)	
	0,15-0,22	31 (30,1)	24 (23,3)	48 (46,6)	
	>0,23	63 (57,8)	7 (6,4)	39 (35,8)	

### 5.2.2.2 Proteína hk2 y combinaciones de calicreinas

Se analizó la asociación de la calicreína humana 2 con el resultado de la biopsia. Asimismo se observa la relación de los cocientes hk2/PSA total, hk2/PSA libre y hk2xPSA total/PSA libre, con el resultado de la biopsia.

a. hk2

No se observó asociación estadísticamente significativa entre la proteína hk2 y el resultado de la biopsia ( $p = 0,146$ ) Un 50% de los pacientes del cuartil de concentración de hk2 menor de 0,03 tenían biopsias positivas, frente al 27% y 31,5% del resto de los cuartiles de la proteína. Hay que tener en cuenta que el número total de pacientes del grupo hk2 menor de 0,03 es escaso (Tabla 5-19).

Tabla 5-19. Distribución de frecuencias del resultado de la biopsia en función de los cuartiles de la proteína hk2, N (%)

	Cuartiles	Biopsia +	ASAP/PINAG	Biopsia -	p
<b>hk2 ng/dl</b>	<0,03	8 (50,0)	4 (25,0)	4 (25,0)	0,146
	=0,03	69 (27,2)	47 (18,5)	138(54,3)	
	0,04-0,08	10 (27,0)	3 (8,1)	24 (64,9)	
	>0,08	34 (31,5)	19 (17,6)	55 (50,9)	

b. Asociaciones de la concentración de la proteína hk2 con las formas moleculares del PSA

Como se observa en la Tabla 5-20, los cocientes que relacionan el PSA total con la proteína hk2 presentan una relación significativa con el resultado de la biopsia. En el cuartil cociente hk2/PSA total menor de 0,29 es más frecuente encontrar pacientes con biopsia positiva (48,1%), que ASAP/PINAG 13,5% y biopsia negativa 38,5%. Asimismo en el cuartil cociente hk2/PSA total mayor de 1,07 un 58,8% de los pacientes presentaron resultado negativo para malignidad ( $p < 0,001$ ).

Con respecto a la relación del resultado de la biopsia con hk2x PSA total/libre existe igualmente asociación estadísticamente significativa. En el grupo de pacientes en el cuartil inferior (<0,16) tienen con más frecuencia un resultado negativo en la biopsia (55,8%), ( $p=0,012$ ).

Con respecto a la relación entre el resultado de la biopsia con el cociente hk2/PSA libre no se observó asociación significativa ( $p = 0,86$ ).

Tabla 5-20. Distribución de frecuencias del resultado de la biopsia de próstata en relación a los cocientes de hK2 y las formas moleculares del PSA en los 419 pacientes.

Variable	Cuartiles	Biopsia +	ASAP/PINAG	Biopsia -	p
<b>hk2/PSA</b>	<0,29	50(48,1)	14 (13,5)	40 (38,5)	<b>&lt;0,001</b>
<b>total %</b>	0,3-0,52	23 (21,9)	55 (52,4)	27 (25,7)	
	0,53-1,06	25 (24,0)	13 (12,5)	66 (63,5)	
	>1,07	23 (22,5)	19 (18,6)	60 (58,8)	
<b>hk2/PSA</b>	<2.02	35(34,0)	17 (16,5)	51 (49,5)	0,860
<b>libre %</b>	2,03-3,65	26(24,8)	19 (18,1)	60 (57,1)	
	3,66-7,75	30(29,1)	17 (16,5)	56 (54,4)	
	>7,76	28 (27,5)	20 (19,6)	54 (52,9)	
<b>hk2x</b>	<0,16	22 (21,2)	24 (23,1)	58 (55,8)	<b>0,012</b>
<b>PSA</b>	0,16-0,28	23 (22,3)	22 (21,2)	58 (56,3)	
<b>total/libre</b>	0,28-0,59	32 (30,5)	13 (12,4)	60 (57,1)	
	>0,59	42 (41,6)	14 (13,8)	45 (44,6)	

## 5.2.3 ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LAS VARIABLES GENÉTICAS CON EL RESULTADO DE LA BIOPSIA

### 5.2.3.1 Análisis genotípico:

La relación entre los genotipos del polimorfismo CT 198977 y el resultado de la biopsia de próstata no mostró asociación significativa. La presencia del genotipo TT fue más frecuente en los varones con biopsia positiva (32,1%) o negativa (56,6%) que en los pacientes con ASAP/PINAG (11,3%) Los pacientes con genotipo CC tenían un 27,9% de biopsias positivas, el CT un 29,6% y el genotipo TT un 32,1%.(p=0,54) (Tabla 5-21).

La distribución de los subgrupos genotípicos están en equilibrio Hardy Weinberg (HWE):

- En biopsia positiva:  $\chi^2=0,28$ ,  $p=0,59$
- En ASAP/ATIPIA:  $\chi^2=0,02$ ,  $p=0,88$
- En biopsia negativa:  $\chi^2=0,38$ ,  $p=0,53$

### 5.2.3.2 Análisis alélico:

Analizamos también la relación existente entre cada alelo por separado y el resultado de la biopsia transrectal.

La relación entre el alelo C y el resultado de la biopsia no fue estadísticamente significativa. De los pacientes con el alelo C un 28,7% tenían biopsias positivas. La presencia de alelo C en los pacientes con biopsia negativa es del 52,9% frente a los 28,7% de biopsias positivas ( $p=0,42$ ).

Con respecto al alelo T tampoco existe relación significativa en función al resultado de biopsia. De los pacientes con alelo T un 30,2% tenían biopsia positiva. La distribución de frecuencias entre los genotipos y la biopsia es muy similar ( $p=0,32$ ).

Tabla 5-21. Distribución de frecuencias del polimorfismo CT 198977 y los alelos en relación con el resultado de la biopsia en los 419 pacientes, N (%)

Polimorfismo		Biopsia +	ASAP/PINAG	Biopsia -	p
<b>Genotipos</b>	CC	51(27,9)	38(20,8)	94 (51,4)	0,544
	CT	53 (29,6)	29 (16,2)	97 (54,2)	
	TT	17 (32,1)	6 (11,3)	30 (56,6)	
<b>ALELO C</b>	SI	104(28,7)	67 (18,5)	192(52,9)	0,427
	NO	17 (32,7)	6 (11,5)	29 (55,8)	
<b>ALELO T</b>	SI	70 (30,2)	35 (15,1)	127(54,7)	0,322
	NO	51 (27,9)	38 (20,8)	94 (51,4)	

## 5.3 ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LAS VARIABLES GENÉTICAS Y LA PROTEÍNA HK2 CON LOS PARÁMETROS CLÍNICO PATOLÓGICOS.

### 5.3.1 POLIMORFISMO C/T 198977

Se ha estudiado la relación existente entre el polimorfismo rs 188977 C/T y los alelos T y C, con las diferentes variables clínico patológicas.

## GENOTIPOS

Al analizar la relación entre el IMC y los genotipos (CC, CT, TT) del *gen KLK2*, se observa que existe una asociación estadísticamente significativa ( $p=0,002$ ) Como se puede observar en la Tabla 5-22 dentro de los pacientes con IMC menor de 25 es más frecuente tener un genotipo CC (50,3%).

Con respecto al tacto rectal también se relaciona de forma significativa con los genotipos del *gen KLK2* ( $p =0,004$ ) En los pacientes con un tacto rectal grado II/IV es más frecuente tener un genotipo CC (47,8%) En cambio en los pacientes con un tacto rectal grado III es más frecuente tener un genotipo CT (60%) En el estadio IV/IV no se observa ningún paciente TT (Tabla 5-22).

Se analiza la relación de los genotipos con la presencia de síntomas de tracto urinario (STUI) Dentro de los pacientes con síntomas de llenado o vaciado del tracto urinario inferior es más frecuente tener un genotipo CC (51%) que CT (38,4%) o TT (15,4%), ( $p= 0,004$ ) (Tabla 5-22).

Con respecto a la presencia o no de disfunción eréctil se observa una tendencia a la significación estadística con los genotipos del gen ( $p=0,051$ ) En la Tabla 5-22 se puede observar como dentro del grupo que tiene disfunción eréctil el genotipo TT es menos frecuente (9,5%) que los demás.

Con respecto a la etnia se observa una relación con tendencia a la significación con los genotipos del gen ( $p= 0,070$ ) La mayoría de los pacientes (98,3%) son europeos, frente a un mínimo porcentaje de negros (0,2%) y latinos (1%).

Asimismo se observó que existía una débil tendencia a la significación en la relación existente entre los estadios clínicos órgano confinado (T1c-T2c) y localmente avanzado ( $\geq T3a$ ), con los genotipos del *gen KLK2* ( $p=0,081$ ) Dentro de los pacientes con estadio T1c-T2a un 50,7% eran varones con tumores con genotipo CC. En los pacientes con estadio T2b-T2c un 60,4% eran CT, y en el

genotipo TT un 58,8% eran T1c-T2a. Los pacientes con estadios mayor o igual a T3a, el 46,6 % eran CC.

Tabla 5-22. Distribución de frecuencias de los genotipos CC, CT y TT en relación a las variables clínico patológicas del estudio en los 419 pacientes N(%).

Variables		CC	CT	TT	p
<b>IMC</b>	<25	78 (50,3)	61 (39,3)	16 (10,3)	<b>0,002</b>
	25-30	83 (46,3)	66 (36,8)	30 (16,7)	
	>30	24 (28,5)	51 (60,7)	9 (10,7)	
<b>Tacto rectal</b>	I/IV	26 (44,8)	26 (44,8)	6 (10,3)	<b>0,004</b>
	II/IV	145(47,8)	119(39,2)	39 (12,8)	
	III/IV	13(23,6)	33 (60)	9 (16,3)	
	IV/IV	1 (50)	1 (50)	0	
<b>STUI</b>	SI	117(51)	88 (38,4)	24 (15,4)	<b>0,004</b>
	NO	67 (35,4)	91 (48,1)	31 (16,4)	
<b>DE</b>	SI	85(42,9)	94 (47,7)	19 (9,4)	0,051
	NO	100(45,4)	84 (38,1)	36 (16,3)	
<b>TNM</b>	T1c-T2a	32(50,7)	21 (33,3)	10 (15,8)	0,081
	T2b-T2c	12 (27,9)	26 (60,4)	5 (11,6)	
	≥T3a	7(46,6)	6 (40,0)	2 (13,3)	
<b>hk2 (ng/dl)</b>	<0,03	8 (50)	6(37,5)	2(12,5)	0,761
	=0,03	110(43,1)	106(41,5)	39(15,2)	
	0,04-0,08	18(47,3)	17(44,7)	3(7,8)	
	>0,08	49(44,5)	50(45,4)	11(10)	

Se analizaron el resto de las variables relacionadas con datos clínico patológicos y formas moleculares del PSA y proteína hk2. El estudio de la asociación de éstas con los genotipos no encontró relación estadísticamente significativa.

### **ALELOS**

Se ha analizado la relación de cada alelo por separado con las diferentes variables del estudio.

#### **a. ALELO C**

De todas las variables clínico-patológicas se ha obtenido significación en dos de ellas: la presencia de disfunción eréctil y el consumo de grasas (Tabla 5-23).

Cuando se analiza la relación entre la presencia de disfunción eréctil y el alelo C se observa que dentro de los pacientes con disfunción eréctil es más frecuente tener el alelo C (90,4%;  $p= 0,037$ ).

Con respecto al consumo de grasas, dentro del grupo de pacientes que consume abundantes grasas un 92,4% de los varones tenían alelo C ( $p= 0,02$ ).

Se analiza la presencia de síntomas del tracto urinario y se observa una tendencia a la significación con respecto a la relación con el alelo C ( $p =0,06$ ) El alelo C está presente en un 89,5% de los pacientes que tienen síntomas del tracto urinario inferior.

*Tabla 5-23. Distribución de frecuencias del alelo C en función de la presencia de las variables clínico patológicas en los 419 pacientes, N (%)*

		PRESENCIA ALELO C	AUSENCIA ALELO C	P
<b>DE</b>	SI	179 (90,4)	19 (9,5)	<b>0,037</b>
	NO	185 (84,0)	35 (15,9)	
<b>GRASAS</b>	SI	122 (92,4)	19 (7,5)	<b>0,020</b>
	NO	241 (84,8)	43 (15,1)	
<b>STUI</b>	SI	205 (89,5)	24 (10,4)	0,068
	NO	159 (84,1)	30 (15,8)	

El resto de las variables tanto referentes a la descripción clínica de la próstata, como al tumor, y a las calicreinas (hK2 y formas moleculares del PSA) no se ha encontrado relación estadísticamente significativa.

*b. ALELO T*

Se analiza la relación existente entre el alelo T y las variables clínico patológicas registradas en el estudio.

A continuación se muestran y detallan las variables que han mostrado relaciones estadísticamente significativas (Tabla 5-24).

En el análisis de la relación entre la presencia del alelo T y los grupos de IMC, se observa que es más frecuente que los pacientes con un IMC mayor de 30 posean el alelo T (71,4%), frente al 28,5% que no lo tienen. Dentro del grupo de pacientes con IMC de 25-30 es algo más frecuente tener el alelo T (53,6%) que no tenerlo ( $p=0,003$ ).

Se observó relación significativa entre los grados de tacto rectal y la presencia del alelo T en los pacientes ( $p=0,008$ ). Dentro de los pacientes con un tacto rectal grado III/IV es más frecuente tener el alelo T (76,3%) que no tenerlo (23,6%).

Con respecto a la presencia en el tacto rectal de un nódulo palpable la relación existente con el alelo T fue estadísticamente significativa ( $p=0,04$ ). Los pacientes que tenían un nódulo palpable en el tacto rectal tenían mayor presencia del alelo T (64,7%) que los que no (35,2%).

Se analiza la relación entre la presencia de síntomas del tracto urinario inferior y el alelo T. La asociación entre estas variables es estadísticamente significativa  $p=0,001$ . El alelo T es más frecuente en los pacientes con ausencia de síntomas de llenado o vaciado del tracto urinario inferior (64,5%).

La etnia es igualmente analizada. Prácticamente la totalidad de los pacientes son de raza caucásica. La relación que se obtiene con respecto al alelo T es significativa ( $p=0,018$ ).

El estudio de la asociación entre el estadio tumoral y la presencia de alelo T resultó ser estadísticamente significativa ( $p=0,049$ ). La presencia del alelo T es mayor en los pacientes con estadio órgano confinado T2b-T2c (72%).

Se han observado en el estudio algunas variables que no son significativas pero que muestran una relación con tendencia a la significación.

El estudio de la relación entre los grupos de volumen prostático y la presencia del alelo T muestra una asociación con tendencia a la significación con una  $p=0,069$ . Los pacientes con un volumen prostático mayor de 74,6 cc tenían con mayor frecuencia la presencia del alelo T (60,9%) Esto mismo sucedía con los pacientes con un volumen comprendido entre 55-74,6 cc; era más frecuente tener el alelo T (61,9%) que no tenerlo (40,9%).

Con respecto a la HTA, se encontró una relación con tendencia a la significación entre tener HTA y presentar el alelo T ( $p=0,053$ ). Los pacientes con HTA tenían mayor frecuencia del alelo T (60,3%) que los que no lo tenían (39,6%).

Tabla 5-24. Distribución de frecuencias del alelo T en relación a las variables clínico patológicas del estudio en los 419 pacientes, N(%)

Variables		PRESENCIA ALELO T	AUSENCIA ALELO T	P
<b>IMC</b>	<25	77(49,6)	78 (50,3)	<b>0,003</b>
	25-30	96 (53,6)	83 (46,3)	
	>30	60 (71,4)	24 (28,5)	
<b>Tacto rectal</b>	TR I/IV	32(55,1)	26 (44,8)	<b>0,008</b>
	TR II/IV	158 (52,1)	145 (47,8)	
	TR III/IV	42 (76,3)	13 (23,6)	
	TR IV/IV	1 (50,0)	1 (50,0)	
<b>Nódulo palpable</b>	SI	55 (64,7)	30 (35,2)	<b>0,040</b>
	NO	178 (53,4)	155 (46,5)	
<b>STUI</b>	SI	112 (48,9)	117 (51,0)	<b>0,001</b>
	NO	122 (64,5)	67 (35,4)	
<b>Raza</b>	CAUCASICA	227(55,9)	179 (44,0)	<b>0,018</b>
	NEGRA	1 (100,0)	0	
	LATINO	0	4 (100,0)	
	OTRAS	2 (100,0)	0	
<b>HTA</b>	SI	114 (60,3)	75 (39,6)	0,053
	NO	119 (51,9)	110 (48,0)	
<b>Estadio tumoral</b>	T1a-T2a	31(49,2)	32 (50,7)	<b>0,049</b>
	T2b-T2c	31 (72,0)	12 (27,9)	
	T3a	8 (53,3)	7 (46,6)	
<b>Cuartiles volumen prostático</b>	<38,3cc	61(58,6)	43 (41,3)	0,069
	38,3-55cc	47 (44,7)	58 (55,2)	
	56-74,6cc	62 (61,9)	43 (40,9)	
	>74,6cc	64 (60,9)	41 (39,0)	

### 5.3.2 PROTEÍNA HK2 Y SU CORRELACIÓN CON PSA TOTAL Y PSA LIBRE

Se analiza la relación existente entre la proteína hK2 y las combinaciones de esta con el PSA total y PSA libre con las variables clínico patológicas registradas en el estudio.

#### *ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA HK2 CON LAS VARIABLES CLÍNICO PATOLÓGICAS*

La relación entre la concentración de hK2 en suero y la presencia de margen quirúrgico positivo en los pacientes sometidos a prostatectomía radical tiene tendencia a ser significativa ( $p=0,071$ ). En el grupo de pacientes con una concentración sérica de hK2 entre 0,04 y 0,08, un 66,7 % tenían margen quirúrgico positivo. Igualmente los pacientes con una hK2 mayor de 0,08 ng/dl tenían un 53,8 % tenían un margen positivo. En cambio en el grupo de pacientes con proteína igual a 0,03 ng/dl un 83,3% de ellos tenían márgenes quirúrgicos negativos (Tabla 5-25).

Se observa en el estudio de la relación entre la presencia de nódulo palpable en el tacto rectal y la proteína hK2 que no hay relación entre los niveles de la proteína y la presencia de nódulo palpable ( $p=0,132$ ) (Tabla 5-25).

Con respecto a la invasión linfovascular presente en la pieza de prostatectomía el resultado de su relación con las concentraciones en suero de la proteína hK2 no es significativo ( $p=0,104$ ). Es más frecuente tener invasión linfovascular en el grupo de hK2 0,04-0,08 ng/dl, donde un 66,7% de los pacientes tenían invasión linfovascular, frente a un 33,3 % que no la tenían (Tabla 5-25).

Al analizar la relación de la proteína hK2 con el estadio clínico de los tumores de próstata no se observó relación estadísticamente significativa ( $p=0,140$ ). En el grupo de concentración sérica de hK2 mayor de 0,08 es más frecuente tener un estadio clínico T2b-T2c (50%) que tener un estadio locamente avanzado o T1c-

T2a. En el subgrupo de proteína hK2 comprendida entre 0,04-0,08 en cambio es mucho más frecuente tener un estadio T1c-T2 (70%) que un T2b-T2c (10%) o locamente avanzado (20%) En el grupo de proteína menor o igual a 0,03 es más frecuente tener un estadio T1c-T2a (54,5%), seguido en frecuencia por el T2b-T2c (32,5%) (Tabla 5-25).

Tabla 5-25. Distribución de frecuencias de las variables clínico patológicas en relación con las concentraciones séricas de hK2 por percentiles en los 419 pacientes, N(%)

hK2 (ng/dl)	Margen qx +	Margen qx -	p	
< 0,03	0	1 (100,0)	0,071	
= 0,03	3 (16,7)	15 (83,3)		
0,04 – 0,08	2 (66,7)	1 (33,3)		
> 0,08	7 (53,8)	6 (46,2)		
hK2 (ng/dl)	Nódulo palpable SI	Nódulo palpable NO	p	
< 0,03	2 (12,5)	14 (87,5)	0,132	
= 0,03	48 (18,8)	207 (81,2)		
0,04 – 0,08	5 (13,2)	33 (86,3)		
> 0,08	30 (27,5)	79 (72,5)		
hK2 (ng/dl)	Invasión linfovascular SI	Invasión linfovascular NO	p	
< 0,03	0	1 (100)	0,104	
= 0,03	1 (5,3)	18 (94,7)		
0,04 – 0,08	2 (66,7)	1 (33,3)		
> 0,08	2 (14,3)	12 (85,7)		
hK2 (ng/dl)	Estadio T1c-T2a	Estadio T2b-T2c	Estadio ≥T3a	p
≤ 0,03	42 (54,5)	25(32,5%)	10(13,0)	0,140
0,04 – 0,08	7 (70,0)	1 (10,0%)	2 (20,0)	
> 0,08	14 (41,2)	17 (50,0%)	3 (8,8)	

Se llevó a cabo el análisis de la relación existente entre los niveles en suero de la proteína hK2 y el resto de las variables clínico patológicas. No se halló relación significativa estadísticamente entre las variables restantes demográficas (edad, IMC, etnia, historia familiar, STUI, HTA, DM, DE y consumo de grasas). Asimismo tampoco se observó relación significativa en el estudio de la relación de la proteína con las características morfológicas y ecográficas de la próstata: grados tacto rectal, diámetros de la próstata, volumen, tipo y número de la biopsia.

La proteína hK2 no se relaciona significativamente con el PSA ni sus formas moleculares. De igual modo no tiene relación significativa con el grado de Gleason, los grados de D'Amico, el porcentaje de afectación tumoral, el número de cilindros afectados ni el estadio tumoral de la pieza de cirugía.

#### *ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE LAS COMBINACIONES DE LA PROTEÍNA HK2 CON EL PSA TOTAL Y LIBRE, CON LAS VARIABLES CLÍNICO PATOLÓGICAS*

##### HK2/PSA TOTAL

La relación entre el cociente hK2 /PSA total y los grados de tacto rectal mostraron una débil tendencia a la significación. Se observó que es menos frecuente en el grupo de cociente hK2 /PSA total  $> 1,07$  tener un tacto rectal grado III/IV (7,7%) que el resto de grados ( $p=0,058$ ). En los demás cuartiles el tacto rectal menos frecuente es el grado I/IV (11,4%), y el más frecuente es el grado II/IV.

Con respecto a la relación de la presencia de un nódulo palpable en el tacto rectal con el cociente hK2 /PSA total, existe una asociación estadísticamente significativa ( $p= 0,004$ ). Cuando el cociente es menor de 0,29 se asocia con la presencia de nódulo palpable.

Se analizó la relación existente entre la induración en el tacto rectal y el cociente hK2 /PSA total, siendo significativa ( $p=0,010$ ). En el subgrupo de cociente hK2 /PSA total menor de 0,29 es más frecuente tener induración (34,6%) que en el resto de subgrupos (Tabla 5-26).

Cuando se analiza la asociación entre la presencia de asimetría en el tacto rectal y el cociente hK2 /PSA total se puede observar que es más frecuente la presencia de asimetría en el subgrupo de cociente hK2 /PSA total menor de 0,29 (25%) que en el resto de grupos ( $p= 0,001$ ).

Con respecto al borramiento y su relación con el cociente hK2 /PSA total se evidenció una asociación estadísticamente significativa ( $p<0,001$ ). Tan solo 20

pacientes presentaban al tacto una próstata con surco borrado y 14 de ellas tenían un cociente menor de 0,29 (Tabla 5-26).

Se analizó la relación entre el cociente hK2 /PSA total y el tacto rectal con consistencia fibroelástica. Se observó que en el grupo de cociente menor de 0,29 el porcentaje de próstata no fibroelástica era significativamente más frecuente (36,5%) que en el resto de subgrupos ( $p < 0,001$ ) (Tabla 5-26).

Tabla 5-26. Distribución de frecuencias de las variables clínico patológicas del tacto rectal, en función de los cuartiles del cociente hK2 / PSA Total

hK2/PSA tot %	TR I/IV	TR II/IV	TR III/IV	TR IV/IV	p
< 0,29	12(11,5)	71(68,3)	19(18,3)	2 (1,9)	0,058
0,3-0,52	12(11,4)	78(74,3)	15(14,3)	0	
0,53- 1,06	12(11,4)	80(76,2)	13(12,4)	0	
> 1,07	22(21,2)	74(71,2)	8(7,7)	0	
hK2/PSA total %	Nódulo palpable SI	Nódulo palpable NO			p
< 0,29	29(27,9)	75(72,1)			<b>0,004</b>
0,3-0,52	13(12,4)	92(87,6)			
0,53- 1,06	15(14,3)	90(85,7)			
> 1,07	28(26,9)	76(73,1)			
hK2/PSA total %	Induración SI	Induración NO			p
< 0,29	36(34,6)	68(65,4)			<b>0,010</b>
0,3-0,52	18(17,1)	87(82,9)			
0,53- 1,06	20(19)	85(81)			
> 1,07	30(28,8)	64(71,2)			
hK2/PSA total %	Asimetría SI	Asimetría NO			p
< 0,29	26(25,0)	78(75,0)			<b>0,001</b>
0,3-0,52	10(9,5)	95(90,5)			
0,53- 1,06	8(7,6)	97(92,4)			
> 1,07	10(9,6)	94(90,4)			
hK2/PSA total %	Borramiento SI	Borramiento NO			p
< 0,29	14(13,5)	90(86,5)			<b>&lt;0,001</b>
0,3-0,52	1(1,0)	104(99,0)			
0,53- 1,06	3(2,9)	102(97,1)			
> 1,07	2(1,9)	102(98,1)			
hK2/PSA total %	Fibroelástica SI	Fibroelástica NO			p
< 0,29	66(63,5)	38(36,5)			<b>&lt;0,001</b>
0,3-0,52	91(86,7)	14(13,3)			
0,53- 1,06	87(82,9)	18(17,1)			
> 1,07	82(78,8)	22(21,2)			

Se analizó la relación existente entre los grupos de riesgo en función de la clasificación de D'Amico y el cociente hK2 /PSA total se observó una asociación

estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ). En el grupo de cociente hK2 /PSA total menor de 0,29 es más frecuente tener un tumor de alto riesgo que de riesgo intermedio o bajo (56%). En cambio en el grupo de cociente hK2 /PSA total mayor de 1,07 es más frecuente tener un riesgo tumoral bajo (52,2%) (Tabla 5-27).

Con respecto al número de biopsia se analizó su asociación con el cociente hK2 /PSA total. Se observó que la primera biopsia a la que se sometían los pacientes era la más frecuente en todos los subgrupos de cocientes ( $p < 0,001$ ). Dentro de los pacientes con 2ª biopsia 31 (32,2%) de ellos tenían un cociente comprendido entre 0,3-0,52 ng/dl. Los pacientes a los que se les biopsiaba por tercera vez, 20 de ellos (54,0%) correspondían a cocientes menores de 0,29 ng/dl.

Se analizó la relación de la existencia de un nódulo sospechoso en la ecografía con el cociente hK2 /PSA total. En el grupo de pacientes con nódulo sospechoso presente es significativamente más frecuente tener un cociente hK2 /PSA total menor de 0,29 (39,4%) que el resto de subgrupos ( $p = 0,014$ ).

En este análisis que se desarrolló la edad también mostro asociación estadísticamente significativa con el cocientes hK2 /PSA total ( $p < 0,001$ ) Se observó en todos los grupos de cocientes hK2 /PSA total que la franja de edad entre 60 y 70 años era la más frecuente. Sin embargo en el grupo de pacientes con más de 70 años es más frecuente tener un cociente menor de 0,29 frente al resto de subgrupos de cocientes (Tabla 5-27).

Tabla 5-27. Distribución de frecuencias de las variables clínico patológicas, en función de los cuartiles del cociente hk2 / PSA Total

hk2/PSA total %	Riesgo bajo D'Amico	Riesgo intermedio D'Amico	Riesgo alto D'Amico	p	
< 0,29	7(14)	15(30)	28(56)	<b>&lt;0,001</b>	
0,3-0,52	10(43,5)	10(43,5)	3(13)		
0,53- 1,06	14(56)	9(36)	2(8)		
> 1,07	12(52,2)	8(34,8)	3(13)		
hk2/PSA total %	1º biopsia	2º biopsia	3º biopsia	4º biopsia	p
< 0,29	65(62,5)	13(12,5)	20(19,2)	6 (5,8)	<b>&lt;0,001</b>
0,3-0,52	60(57,1)	31(29,5)	10(9,5)	4 (3,8)	
0,53- 1,06	74(70,5)	27(25,7)	3(2,9)	1(1,0)	
> 1,07	82(78,1)	15(14,3)	4(3,8)	4 (3,8)	
hk2/PSA total %	Nódulo sospechoso SI		Nódulo sospechoso NO		p
< 0,29	41(39,4)		63(60,6)		<b>0,014</b>
0,3-0,52	24(22,9)		81(77,1)		
0,53- 1,06	22(21,0)		83(79,0)		
> 1,07	27(25,7)		78(74,3)		
hk2/PSA total %	< 60 años	60-70 años	> 70 años	p	
< 0,29	17(16,3)	44(42,3)	43(41,3)	<b>&lt;0,001</b>	
0,3-0,52	19(18,1)	66(62,9)	20(19)		
0,53- 1,06	22(21)	67(63,8)	16(15,2)		
> 1,07	24(22,9)	62(59)	19(18,1)		

A continuación se analizan las variables referentes a los tumores de próstata (Tabla 5-28).

La asociación entre el porcentaje de afectación tumoral y los grupos de cocientes hk2 /PSA total mostro que era más frecuente el grupo con mayor porcentaje de afectación tumoral. Dentro de este grupo la mayoría de los pacientes tenían un cociente hk2 /PSA total menor de 0,29 (43, 45,7%; p=0,027). En el grupo de afectación tumoral entre el 6-10% ningún paciente tiene un cociente comprendido entre 0,53-1,06.

Se llevó a cabo el estudio de la asociación entre el grado de Gleason tumoral y el cociente hk2 /PSA total. Se observó que esta relación era estadísticamente significativa ya que en el subgrupo de cociente mayor de 1,07 era más frecuente tener un Gleason menor o igual a 6 (73,9%) que otra gradación (p=0,025). Asimismo en el grupo de pacientes con Gleason mayor o igual a 8 era más

frecuente tener un cociente menor de 0,29 (70%: 14 de 20 totales) que cualquier otro subgrupo de cocientes.

Con respecto al estadio clínico del tumor se observó una relación significativa con el cociente hK2 /PSA total ( $p < 0,001$ ). En el grupo de mayor estadio clínico ( $> T3a$ ) es más frecuente tener un cociente hK2 /PSA total  $<$  de 0,29 que otros subgrupos de cociente.

Se analiza la relación existente entre la presencia de márgenes quirúrgicos positivos y el cociente hK2 /PSA total. Esta relación no es estadísticamente significativa pero tiene tendencia a serlo ( $p=0,092$ ). Dentro del grupo de pacientes con márgenes positivos tras la cirugía el 50 % (6) tenían un cociente mayor de 1,07, mientras que ningún paciente tenía un cociente hK2 /PSA total menor de 0,29.

El número de cilindros afectados en la biopsia también se analizó con relación al cociente hK2 /PSA total. Esta asociación no fue estadísticamente significativa pero tiene tendencia a serlo ( $p=0,098$ ). En el grupo de pacientes con un cociente hK2 /PSA total menor de 0,29 el 54% tenían una afectación  $\geq 7$  cilindros, lo que es clínicamente relevante (Tabla 5-28).

Tabla 5-28. Distribución de frecuencias de las variables clínico patológicas de los tumores, en función de los cuartiles del cociente hk2 / PSA Total

hk2/PSA total %	Afectación tumoral ≤5%	Afectación tumoral 6-10%	Afectación tumoral >11%	p
< 0,29	3(6)	4(8)	43(86)	<b>0,027</b>
0,3-0,52	4(17,3)	5(21,7)	14(60,8)	
0,53– 1,06	6(24)	0	19(76)	
> 1,07	4(17,3)	1(4,3)	18(78,2)	
hk2/PSA total %	Gleason =<6	Gleason =7	Gleason =>8	p
< 0,29	21(42)	15(30)	14(28)	<b>0,025</b>
0,3-0,52	13(56,5)	9(39,1)	1(4,3)	
0,53– 1,06	14(56)	9(36)	2(8)	
> 1,07	17(73,9)	3(13)	3(13)	
hk2/PSA total %	Estadio T1c-T2a	Estadio T2b-T2c	Estadio ≥T3a	p
< 0,29	20(40)	16(32)	14(28)	<b>&lt;0,001</b>
0,3-0,52	14(60,9)	8(34,8)	1(4,3)	
0,53– 1,06	17(68)	8(32)	0	
> 1,07	12(52,2)	11(47,8)	0	
hk2/PSA total %	Margen qx SI	Margen qx NO		p
< 0,29	0	4(100)		0,092
0,3-0,52	3(27,2)	8(72,7)		
0,53– 1,06	3(30,0)	7(70,0)		
> 1,07	6(60,0)	4(40,0)		
hk2/PSA total %	≤2 cilindros afectados	3-6 cilindros afectados	≥7cilindros afectados	p
< 0,29	11(22,0)	12(24,0)	27(54,0)	0,098
0,3-0,52	10(43,4)	7(30,4)	6(26,0)	
0,53– 1,06	9(36,0)	10 (40)	6(24,0)	
> 1,07	8(36,3)	8(36,3)	6(27,2)	

Se llevó a cabo el análisis de la relación existente entre los niveles en suero del cociente hk2 /PSA total y el resto de las variables clínico patológicas. No se halló relación significativa estadísticamente entre las variables restantes demográficas (IMC, etnia, historia familiar de cáncer prostático, STUI, HTA, DM, DE y consumo de grasas). Asimismo tampoco se observó relación estadísticamente significativa en el estudio de la relación del cociente hk2 /PSA total con las características morfológicas y ecográficas de la próstata: diámetros de la próstata, volumen, tipo de la biopsia.

### HK2/PSA LIBRE

Se llevó a cabo el análisis de la relación entre el cociente hK2/PSA libre con las variables clínico patológicas del estudio (Tabla 5-29 y Tabla 5-30).

Se analizó la relación existente entre el cociente hK2/PSA libre y los grados de tacto rectal. Se observó que el tacto rectal grado II era el más frecuente en todos los subgrupos de pacientes pero el tacto rectal grado III era más frecuente en el grupo del cociente hK2/PSA libre menor de 2,02 (24,3%) que en los otros subgrupos ( $p = 0,002$ ).

Cuando se analiza la asociación entre la presencia de asimetría en el tacto rectal y el cociente hK2 /PSA libre se puede observar que es más frecuente que en el grupo de pacientes con asimetría en el tacto rectal, el 40 % (N=21) tengan un cociente hK2 /PSA libre menor de 2,02 ( $p=0,049$ ).

Con respecto al borramiento y su relación con el cociente hK2 /PSA libre se evidencio un asociación estadísticamente significativa ( $p=0,009$ ). En los pacientes con tacto rectal borrado es más frecuente tener un cociente hK2 /PSA libre menor de 2.02, (N=11; 61,1%).

Asimismo se estudió la asociación entre el volumen de la próstata y el cociente hK2 /PSA libre. Esta relación mostro que si el paciente tenía un índice hK2 /PSA libre menor de 2,02 era más frecuente tener un volumen prostático > de 74,6 cc (40,8%) ;( $p<0,001$ ).

Tabla 5-29. Distribución de frecuencias de las variables clínico patológicas del tacto rectal del estudio en función del cociente hK2/PSA libre en los 419 pacientes, N(%)

hk2/PSA libre %	TR I/IV	TR II/IV	TR III/IV	TR IV/IV	p
< 2,02	11(10,7)	65(63,1)	25(24,3)	2 (1,9)	<b>0,002</b>
2,03-3,65	10(9,4)	81(76,4)	15(14,2)	0	
3,66-7,75	17(16,3)	79(76)	8(7,7)	0	
> 7,76	20(19,4)	76(73,8)	7(6,8)	0	
hk2/PSA libre %	Asimetría SI	Asimetría NO		p	
< 2,02	21(20,4)	82(79,6)		<b>0,049</b>	
2,03-3,65	10(9,4)	96(90,6)			
3,66- 7,75	11(10,6)	93(89,4)			
> 7,76	10(9,7)	93(90,3)			
hk2/PSA libre %	Borramiento SI	Borramiento NO		p	
< 2,02	11(10,7)	92(89,3)		<b>0,009</b>	
2,03-3,65	2(1,9)	104(98,1)			
3,66- 7,75	2(1,9)	102(98,1)			
> 7,76	3(2,9)	100(97,1)			
hk2/PSA libre %	Volumen prostático < 38,3 cc	Volumen prostático 38,3-55 cc	Volumen prostático 56-74,6 cc	Volumen prostático >74,6 cc	p
< 2,02	18(17,5)	19(18,4)	24(23,3)	42(40,8)	<b>&lt;0,001</b>
2,03-3,65	19(17,9)	24(22,6)	34(32,1)	29(27,4)	
3,66- 7,75	26(25,0)	36(34,6)	23(22,1)	19(18,3)	
> 7,76	40(38,5)	26(25)	24(23,1)	14(13,5)	

La asociación entre los grupos de riesgo según D'Amico y el cociente hK2/PSA libre es estadísticamente significativa ( $p=0,001$ ). Dentro del grupo del cociente hK2/PSA libre menor de 2,02 es más frecuente tener un cáncer de próstata de alto riesgo (57,1%) que de bajo riesgo o riesgo intermedio.

Se analiza la asociación entre presentar síntomas del tracto urinario inferior y el cociente hK2 /PSA libre. Esta relación muestra que es más frecuente en el grupo de pacientes con un cociente hK2 /PSA libre menor de 2,02 tener síntomas de tracto urinario inferior (67,0%), ( $p=0,019$ ).

La relación con el número de biopsia en el momento del estudio y el cociente hK2 /PSA libre mostro que era más frecuente en el grupo de pacientes con

tercera biopsia de próstata tener un cociente hK2 /PSA libre < de 2,02 (N=18, 48,6%). La primera biopsia es la más frecuente en todos los cuartiles (p= 0,006).

En este análisis que se desarrolló la edad también mostro asociación estadísticamente significativa con el cociente hK2 /PSA libre (p <0,001) Se observó en todos los grupos de cocientes hK2 /PSA libre que la franja de edad entre 60 y 70 años era la más frecuente. Sin embargo en el grupo de pacientes con más de 70 años es más frecuente tener un cociente menor de 2,02 frente al resto de subgrupos de cocientes (42 pacientes de 98 que tienen más de 70 años, lo que supone un 42,8% de estos).

Con respecto a la asociación del cociente hK2 /PSA libre con la presencia de margen quirúrgico positivo en la pieza de prostatectomía radical, en el subgrupo con cociente mayor de 7,76 es más frecuente tener márgenes positivos que no tenerlos (53,8%). Conforme va aumentando el cociente hK2 /PSA libre, va aumentando la posibilidad de márgenes quirúrgicos positivos siendo clínicamente relevante (p=0,089).

Tabla 5-30. Distribución de frecuencias de las variables clínico patológicas del estudio en función del cociente hK2/PSA libre en los 419 pacientes, N(%)

hk2/PSA libre %	Riesgo bajo D'Amico	Riesgo intermedio D'Amico	Riesgo alto D'Amico	p	
< 2,02	9(25,7)	6(17,1)	20(57,1)	<b>0,001</b>	
2,03-3,65	8(30,8)	12(46,2)	6(23,1)		
3,66-7,75	15(50)	11(36,7)	4(13,3)		
> 7,76	11(39,3)	13(46,4)	4(14,3)		
hk2/PSA libre %	STUI SI	STUI NO	p		
< 2,02	69(67,0)	34(33,0)	<b>0,019</b>		
2,03-3,65	52(49,5)	53(50,5)			
3,66- 7,75	49(47,1)	55(52,9)			
> 7,76	57(54,8)	47(45,2)			
hk2/PSA libre %	1º biopsia	2º biopsia	3º biopsia	4º biopsia	p
< 2,02	63(61,2)	19(18,4)	18(17,5)	3(2,9)	<b>0,006</b>
2,03-3,65	65(61,3)	27(25,4)	9(8,5)	5(4,7)	
3,66- 7,75	67(64,4)	27(26,0)	6(5,8)	4(3,8)	
> 7,76	84(80,4)	13(12,5)	4(3,8)	3(2,9)	
hk2/PSA libre %	< 60 años	60-70 años	> 70 años	p	
< 2,02	13(12,6)	48(46,6)	42(40,8)	<b>&lt;0,001</b>	
2,03-3,65	18(17,0)	70(66,0)	18(17,0)		
3,66- 7,75	24(23,1)	59(56,7)	21(20,2)		
> 7,76	26(25,0)	61(58,7)	17(16,3)		
hk2/PSA libre %	Margen qx SI	Margen qx NO	p		
< 2,02	1(25,0)	3(75,0)	0,089		
2,03-3,65	0	5(100,0)			
3,66- 7,75	4(30,8)	9(69,2)			
> 7,76	7(53,8)	6(46,2)			

Se llevó a cabo el análisis de la relación existente entre los niveles en suero del cociente hK2 /PSA libre y el resto de las variables clínico patológicas. No se halló relación significativa estadísticamente entre las variables restantes demográficas (IMC, etnia, historia familiar de cáncer prostático, HTA, DM, DE y consumo de grasas). Asimismo tampoco se observó relación estadísticamente significativa en el estudio de la relación del cociente hK2 /PSA libre con las características morfológicas y ecográficas de la próstata: nódulo sospechoso, nódulo palpable, tipo y número de la biopsia. Asimismo no muestra relación estadísticamente significativa con las variables referentes a las características

del cáncer de próstata: grados de Gleason, margen quirúrgico positivo, invasión linfovascular y perineural, estadio clínico, porcentaje de afectación tumoral, cilindros afectados. Con respecto a la asociación del cociente con las formas moleculares del PSA no tiene sentido su realización ya que en el cociente está el PSA libre.

#### HK2x PSA TOTAL/PSA LIBRE

Se llevó a cabo el análisis de la relación entre la combinación de las tres calicreinas hK2x PSA total/PSA libre con las variables clínico patológicas del estudio (Tabla 5-31 y 5-32).

Se analizó la relación existente entre la combinación hK2x PSA total/PSA libre y los grados de tacto rectal. Se observó que el tacto rectal grado II era el más frecuente en todos los subgrupos de pacientes pero el tacto rectal grado III se asocia clínicamente con la combinación hK2x PSA total/PSA libre < de 0,16 (21,2%) que en los otros subgrupos ( $p=0,05$ ).

Así mismo se estudió la asociación entre el volumen de la próstata y la combinación hK2x PSA total/PSA libre. Esta relación mostro que era más frecuente tener un volumen prostático > de 74,6 cc si el paciente tenía la combinación hK2x PSA total/PSA libre < de 0,16 (39,4%;  $p < 0,001$ ) Asimismo era más frecuente dentro del grupo del índice mayor de 0,59 tener un volumen prostático menor de 38,3 cc.

Con respecto a la presencia de síntomas del tracto urinario inferior la asociación de éstos con la combinación hK2x PSA total/PSA libre mostro una tendencia a la significación estadística ( $p=0,074$ ). Dentro del subgrupo de pacientes con índice menor de 0,16 un 65% presentaban síntomas del tracto urinario inferior.

Tabla 5-31. Distribución de frecuencias de las variables clínico patológicas del estudio en función de la combinación hK2x PSA total/PSA libre. N (%)

hk2xPSA total/ libre	TR I/IV	TR II/IV	TR III/IV	TR IV/IV	p
< 0,16	16(15,4)	65(62,5)	22(21,2)	1 (1,0)	0,051
0,16-0,28	10(9,5)	85(81,0)	10(9,5)	0	
0,29-0,59	13(12,5)	76(73,1)	15(14,4)	0	
>0,59	19(18,4)	75(72,8)	8(7,8)	1(1,0)	
hk2xPSA total/ libre %	Volumen < 38,3 cc	Volumen 38,3- 55 cc	Volumen 56- 74,6 cc	Volumen >74,6 cc	p
< 0,16	19(18,3)	21(20,2)	23(22,1)	41(39,4)	0,001
0,16-0,28	17(16,2)	30(28,6)	36(34,3)	22(21)	
0,29-0,59	29(27,6)	29(27,6)	23(21,9)	14(22,9)	
>0,59	38(36,9)	25(24,3)	23(22,3)	17(16,5)	
hk2xPSA total/libre %	Si STUI		No STUI		p
< 0,16	67(65,0)		36(35,0)		0,074
0,16-0,28	56(53,3)		49(46,7)		
0,29-0,59	50(47,6)		55(52,4)		
>0,59	54(52,4)		49(47,6)		

La asociación entre los grupos de riesgo según D'Amico y la combinación hK2x PSA total/PSA libre es estadísticamente significativa ( $p=0,006$ ) En el grupo de cociente comprendido entre 0,16-0,28 el 60,9% de los varones tenían un riesgo bajo. En cambio en el cociente mayor de 0,59 el 37,5% ( $n=15$ ) de los pacientes tenían un riesgo alto en la clasificación pronóstica del cáncer de próstata. Estos 15 pacientes corresponden al 44,1% de todos los pacientes que tienen un riesgo elevado en la clasificación de grupos pronósticos de cáncer de próstata.

Con respecto al porcentaje de afectación tumoral en relación a la combinación hK2x PSA total/PSA libre existe una tendencia a la relación estadísticamente significativa con una  $p=0,060$  muy cercana a 0,05. Es clínicamente relevante que dentro del subgrupo de pacientes con índice mayor de 0,59; el 88,1 % de estos tengan afectación tumoral mayor del 10%, mientras en los demás subgrupos el porcentaje es menor y está distribuido entre el 5 y el 10% de afectación tumoral.

Se llevó a cabo el estudio de la asociación entre el grado de Gleason tumoral y la combinación hk2x PSA total/PSA libre. Al igual que con el porcentaje de afectación tumoral existe una tendencia a la significación estadística con p de 0,065. Los pacientes con un Gleason mayor o igual a 8 el 47,3% (N=9) se asocian con una combinación hk2x PSA total/PSA libre mayor de 0,59. Es relevante que en el grupo de pacientes con cociente comprendido entre 0,16 y 0,28 no exista ningún paciente con Gleason mayor de 8.

La relación de la combinación hk2x PSA total/PSA libre con el estadio tumoral de la pieza de prostatectomía radical muestra igualmente una tendencia a la significación estadística (p=0,080). En los subgrupos con índices mayores (de 0,20 a 0,59; y mayor de 0,59) la mayoría de los pacientes (un 66,7% y un 50% respectivamente) tenían en la pieza un estadio tumoral pT2c.

Tabla 5-32. Distribución de frecuencias de las variables clínico patológicas de los tumores del estudio en función de la combinación hk2x PSA total/PSA libre. N (%)

hk2xPSA total/libre %	Riesgo bajo D'Amico	Riesgo intermedio D'Amico	Riesgo alto D'Amico	p		
< 0,16	10(45,5)	3(13,6)	9(40,9)	<b>0,006</b>		
0,16-0,28	14(60,9)	7(30,4)	2(8,7)			
0,29-0,59	8(25,0)	16(50,0)	8(25,0)			
>0,59	11(26,2)	16(38,1)	15(37,5)			
hk2xPSA total/libre %	Afectación tumoral ≥5%	Afectación tumoral 6-10%	Afectación tumoral >10%	p		
< 0,16	5(22,7)	1(4,5)	16(72,7)	0,060		
0,16-0,28	6(26,1)	3(13,0)	14(60,9)			
0,29-0,59	2(6,3)	5(15,6)	25(78,1)			
>0,59	4(9,5)	1(2,4)	37(88,1)			
hk2xPSA total/libre %	Gleason =<6	Gleason =7	Gleason =>8	p		
< 0,16	13(59,1)	4(18,2)	5(22,7)	0,065		
0,16-0,28	16(69,6)	7(30,4)	0			
0,29-0,59	15(46,9)	12(30,5)	5(15,6)			
>0,59	21(50,0)	12(28,6)	9(21,4)			
hk2xPSA total/libre %	Estadio pT2a	Estadio pT2b	Estadio pT2c	Estadio pT3a	Estadio pT3b	p
< 0,16	2(50,0)	1(25,0)	1(25,0)	0	0	0,080
0,16-0,28	1(16,7)	1 (16,7)	2(33,3)	1(16,7)	1 (16,7)	
0,29-0,59	3(33,3)	0	6 (66,7)	0	0	
>0,59	1(6,3)	0	8(50,0)	5 (31,3)	2 (12,5)	

Al analizar la relación existente de la combinación hK2x PSA total/PSA libre y el resto de las variables clínico patológicas, no existe asociación significativa con ellas.

## 5.4 ANÁLISIS ESTRATIFICADO DE LAS VARIABLES GENÉTICAS Y PROTEÍNA HK2

### 5.4.1 ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO C/T rs 198977 Y LOS ALELOS CON EL RESULTADO DE LA BIOPSIA, ESTRATIFICADO POR LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS.

Se ha estudiado la asociación entre el polimorfismo C/T rs 198977 y el resultado de la biopsia de próstata, estratificado por las diferentes variables clínico-patológicas incluidas en el estudio (Tabla 5-33).

En el análisis estratificado en función de los cuartiles de hK2/ PSA libre se observó una tendencia a la significación estadística en la relación entre el polimorfismo rs 198977 y el resultado de la biopsia en el grupo hK2/PSA libre 3,66-7,75 ( $p=0,055$ ). En ese subgrupo, los pacientes con genotipo TT, el 57 % (N=8) tenían biopsia positiva y ningún paciente ASAP/PINAG.

Tabla 5-33. Análisis estratificado en función del cociente hK2/PSA libre, del polimorfismo y el resultado de la biopsia de los 419 pacientes, N(%)

Hk2/ PSA libre	Polimorfismo	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
<b>&lt; 2,02</b>	CC	16(40,0%)	9 (22,5%)	15(37,5%)	0,384
	CT	14(29,2%)	6 (12,5)	28(58,3%)	
	TT	5(33,3%)	2 (13,3)	8(53,3)	
<b>2,02-3,65</b>	CC	10(20,4%)	10 (20,4)	29 (59,2)	0,588
	CT	14(32,6%)	6 (14)	23 (53,5)	
	TT	2(15,4%)	3 (23,1)	8(61,5)	
<b>3,66-7,75</b>	CC	10(22,2%)	9 (20)	26(57,8)	0,055
	CT	12(27,3%)	8 (18,2)	24 (54,5)	
	TT	8(57,1%)	0	6 (42,9)	
<b>&gt;7,75</b>	CC	15(30,6%)	10(20,4)	24(49,0)	0,457
	CT	12(27,9%)	9 (20,9)	22(51,2)	
	TT	1(10,0%)	1 (10)	8(80,0)	

Cuando analizamos la relación entre el polimorfismo rs 198977 y el resultado de la biopsia estratificando en función de los cuartiles de hK2x PSA total/PSA libre no se observa relación estadísticamente significativa pero existe una tendencia ( $p=0,066$ ) en el subgrupo de pacientes con hK2 x PSA total/PSA libre < de 0,16 . Dentro de los pacientes con genotipo CC el 25% tenían biopsia positiva frente al 18,6 de CT y el 15,4 de TT (Tabla 5-34).

Tabla 5-34. Análisis estratificado en función del cociente hK2xPSA total/PSA libre, del polimorfismo y el resultado de la biopsia de los 419 pacientes, N(%)

Hk2 x PSA Total/Libre	Polimorfismo	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA –	P
<b>&lt;0,16</b>	CC	12(25,0)	16(33,3)	20(41,7)	0,066
	CT	8(18,6)	7(16,3)	28(65,1)	
	TT	2(15,4)	1(7,7)	10(76,9)	
<b>0,16-0,28</b>	CC	6(15,8)	9(23,7)	23(60,5)	0,788
	CT	12(25,0)	10(20,8)	26(54,2)	
	TT	5(29,4)	3(17,6)	9(52,9)	
<b>0,29-0,59</b>	CC	13(25,0)	8(15,4)	31(59,6)	0,443
	CT	12(31,6)	3(7,9)	23(60,5)	
	TT	7(46,7)	2(13,3)	6(40,0)	
<b>&gt;0,59</b>	CC	20(44,4)	5(11,1)	20(44,4)	0,356
	CT	20(40,8)	9(18,4)	20(40,8)	
	TT	2(28,6)	0(0)	5(71,4)	

Cuando se estratifica en función de la concentración sérica de hK2, cuando es menor de 0,03 se obtiene una relación significativa ( $p=0,015$ ) debida a que de los pacientes con genotipo TT el 50% tenían biopsia positiva. Esto puede tener relevancia clínica pero el insuficiente número de pacientes TT impide establecer conclusiones en este sentido (Tabla 5-35).

Tabla 5-35. Análisis estratificado en función de hK2, del polimorfismo y el resultado de la biopsia de los 419 pacientes, N(%)

Hk2 ng/ml	Polimorfismo	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
<b>&lt;0,03</b>	CC	21(48,8)	7(16,3)	15(34,9)	<b>0,015</b>
	CT	21(46,7)	6(13,3)	18(40,0)	
	TT	8(50,0)	2(12,5)	6(37,5)	
<b>=0,03</b>	CC	19(33,9)	11(19,6)	26(46,4)	0,377
	CT	18(50,0)	3(8,3)	15(41,7)	
	TT	3(27,3)	1(9,1)	7(63,6)	
<b>0,04-0,08</b>	CC	8(18,6)	12(27,9)	23(53,5)	0,683
	CT	10(21,7)	11(23,9)	25(54,3)	
	TT	5(33,3)	2(13,3)	8(53,3)	
<b>&gt;0,08</b>	CC	3(7,3)	8(19,5)	30(73,2)	0,727
	CT	4(7,7)	9(17,3)	39(75,0)	
	TT	1(9,1)	1(9,1)	9(81,8)	

El resto de las variables clínico patológicas que se han usado para realizar la estratificación, no han demostrado tener una relación estadísticamente significativa.

#### **ALELO C**

En esta investigación se ha estudiado igualmente la asociación entre el alelo C y el resultado de la biopsia de próstata, estratificado por las diferentes variables clínico-patológicas del estudio (Tabla 5-36).

En la estratificación según la presencia de una próstata indurada en el tacto rectal se observa una tendencia a la significación ( $p=0,058$ ) entre el alelo C y el resultado de la biopsia en el grupo de tacto rectal con induración. Dentro del grupo con induración, el 60% de los pacientes con presencia de alelo C tienen una biopsia positiva para cáncer de próstata.

Se estratifico también en función de si la próstata en el tacto rectal era adenomatosa o no lo era. Se analizó por tanto según esta variable la asociación entre la presencia de alelo C y el resultado de biopsia. Esta relación tendía a ser estadísticamente significativa ( $p=0,052$ ). El 52,7% de los pacientes con alelo C en

el grupo de próstata no adenomatosa tenían tumor en la biopsia frente al 31,3% con alelo C que no lo tenían.

Se analizó la relación entre el alelo C y el resultado de la biopsia en función de los grupos de PSA libre. Se obtuvo una asociación estadísticamente significativa ( $p=0,047$ ) cuando se estudió en el grupo de pacientes con PSA libre menor de 0,7 ng/dl. Dentro de este grupo todos los pacientes con ASAP/PINAG en la biopsia tenían alelo C, el 100%. El 29,9% en este grupo tenían biopsia positiva frente al 51,7% que era negativa para tumor.

Se estratifico en función de los cuartiles de hK2/ PSA libre que se establecieron en el análisis. Se analizó la relación entre la presencia de alelo C y el resultado de la biopsia. Se demostró una relación significativa en el grupo con cociente hK2/PSA libre entre 3,66- 7,75 ( $p=0,008$ ) En este subgrupo el 56,7% de los pacientes con alelo C tenían un resultado negativo en la biopsia, el 18,9% tenían ASAP/PINAG y el 24,4 % tenían biopsia positiva.

Tabla 5-36. Análisis estratificado en función las variables clínico patológicas, del alelo C y el resultado de la biopsia en los 419 pacientes. N (%)

Induración	Alelo C	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
<b>Si</b>	SI	52(60,5%)	12 (14%)	22 (25,6)	0,058
	NO	8 (53,3)	0	7 (46,7)	
<b>No</b>	SI	52 (18,8)	55 (19,9)	170(61,4)	0,539
	NO	9 (25,0)	5 (13,9)	22 (61,1)	
Adenomatosa	Alelo C	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
<b>Si</b>	SI	45(17,9)	49 (19,5)	157 (62,5)	0,714
	NO	5 (15,2)	5 (15,2)	23 (69,7)	
<b>No</b>	SI	59 (52,7)	18 (16,1)	35 (31,3)	0,052
	NO	12 (66,7)	0	6 (33,3)	
PSA libre	Alelo C	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
<b>&lt; 0,7</b>	SI	26(29,9)	16 (18,4)	45 (51,7)	<b>0,047</b>
	NO	7 (46,7)	0	8 (53,3)	
<b>0,8-1,11</b>	SI	25 (27,2)	16 (17,4)	51 (55,4)	0,916
	NO	3 (23,1)	2 (15,4)	8 (61,5)	
<b>1,12-1,74</b>	SI	22 (24,2)	18 (19,8)	51 (56,0)	0,954
	NO	2 (20,0)	2 (20,0)	6 (60,0)	
<b>&gt;1,74</b>	SI	30 (32,6)	17 (18,5)	45(48,9)	0,937
	NO	4 (30,8)	2 (15,4)	7 (53,8)	
hK2/PSA libre	Alelo C	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
<b>&lt; 2,02</b>	Si	30 (34,1)	15(17,0)	43(48,9)	0,920
	No	5 (33,3)	2 (13,3)	8(53,3)	
<b>2,02-3,65</b>	Si	24 (26,1)	16 (17,4)	52(56,5)	0,658
	No	2 (14,4)	3 (23,1)	8 (61,5)	
<b>3,66-7,75</b>	Si	22 (24,4)	17 (18,9)	51(56,7)	<b>0,008</b>
	No	8 (61,5)	0	5 (38,5)	
<b>&gt;7,75</b>	Si	27(29,3)	19 (20,7)	46(50,0)	0,169
	No	1 (10,0)	1 (10,0)	8 (80,0)	

En el análisis estratificado del resto de las variables clínico-patológicas del estudio, no se han observado asociaciones significativas entre el alelo C y el resultado de la biopsia.

### ALELO T

Se ha estudiado la asociación entre el alelo T y el resultado de la biopsia de próstata, estratificado por las diferentes variables clínico-patológicas del estudio (Tabla 5-37).

Se analiza esta relación en función de los grupos de PSA ligado. Los pacientes con PSA ligado comprendido entre 2,94 y 4,16 presentan una tendencia a la

significación estadística entre el alelo T y el resultado de la biopsia ( $p=0,054$ ). Dentro de los pacientes con alelo T era más frecuente obtener un resultado negativo en la biopsia (67,9%) que positiva (25%).

Al estratificar en función del cociente hK2xPSA total/PSA libre la relación del alelo T y la biopsia es significativa ( $p=0,019$ ) en el grupo de pacientes con el cociente hK2xPSA total/PSA libre menor de 0,165. En este cuartil es más frecuente dentro del grupo con alelo T obtener un resultado negativo en la biopsia (67,9%), ASAP/PINAG 14,3% y biopsia positiva 17,9%.

Se analizó la asociación entre el alelo T y el resultado de la biopsia estratificando por la concentración de la proteína hK2 en suero. En el grupo de pacientes con proteína hK2 menor de 0,03 fue significativo que de los 8 pacientes que tuvieron cáncer en la biopsia, el 62,5% no tenían el alelo T frente al 37,5% que si lo tenían ( $p=0,029$ ). Además es clínicamente relevante que todos los pacientes con biopsia negativa tenían presente el alelo T.

Cuando se realiza la estratificación en función del IMC se observa una tendencia a la significación estadística ( $p=0,099$ ) cuando se analiza la relación entre el alelo T y el resultado de la biopsia. Esta tendencia se observa en el subgrupo de pacientes con IMC entre 25 y 30. En este grupo de los pacientes con alelo T el 56,8% (n 54) tenían una biopsia negativa frente al 27,4% (n 26) que es positiva para cáncer.

Al estratificar por la presencia de disfunción eréctil existe una asociación con una ligera tendencia a la significación estadística en el grupo que la padece ( $p=0,067$ ). En este grupo de pacientes el 35,7% de los pacientes con alelo T presente obtuvieron un resultado positivo en la biopsia, frente al 25,2% que se obtuvo de en el subgrupo de pacientes que no tienen disfunción eréctil.

En el estudio estratificado del resto de las variables clínico-patológicas del estudio, no se han observado asociaciones significativas entre el alelo T y el resultado de la biopsia.

Tabla 5-37. Análisis estratificado en función de las variables clínico patológicas, del alelo T y el resultado de la biopsia en los 419 pacientes. N (%)

PSA ligado	Alelo T	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
<b>&lt; 2,93</b>	SI	7 (12,7)	10 (18,2)	38 (69,1)	0,330
	NO	10 (21,3)	11 (23,4)	26 (55,3)	
<b>2,94-4,16</b>	SI	14 (25)	4 (7,1)	38(67,9)	<b>0,054</b>
	NO	6(12,5)	10(20,8)	32(66,7)	
<b>4,17-6,88</b>	SI	18 (29,5)	14 (23,0)	29(47,5)	0,747
	NO	10 (23,8)	9 (21,4)	23 (54,8)	
<b>&gt;6,88</b>	SI	29 (50)	7 (12,1)	22 (37,9)	0,518
	NO	5 (54,3)	8 (17,4)	13 (28,3)	
hK2xPSA T/PSA L	Alelo T	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
<b>&lt; 0,165</b>	SI	10 (17,9)	8 (14,3)	38(67,9)	<b>0,019</b>
	NO	12 (25,0)	16 (33,3)	20(41,7)	
<b>0,166-0,28</b>	SI	17 (26,2)	13 (20,0)	35(53,8)	0,460
	NO	6 (15,8)	9 (23,7)	23 (60,5)	
<b>0,29-0,59</b>	SI	19 (35,8)	5 (9,4)	29(54,7)	0,389
	NO	13(25,0)	8 (15,4)	31 (59,6)	
<b>&gt;0,59</b>	SI	22 (39,3)	9 (16,1)	25 (44,6)	0,737
	NO	20(44,4)	5 (11,1)	20 (44,4)	
hK2 (ng/ml)	Alelo T	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
<b>&lt; 0,03</b>	SI	3 (37,5)	1 (12,5)	4(50,0)	<b>0,029</b>
	NO	5 (62,5)	3(37,5)	0	
<b>=0,03</b>	SI	43 (29,7)	21 (14,5)	81(55,9)	0,147
	NO	26 (23,9)	26 (23,9)	57 (52,3)	
<b>0,04-0,08</b>	SI	5 (26,3)	2 (10,5)	12(63,2)	0,855
	NO	5 (27,8)	1 (5,6)	12 (66,7)	
<b>&gt;0,08</b>	SI	19 (31,7)	11(18,3)	30 (50,0)	0,967
	NO	15 (31,3)	8 (16,7)	25 (52,1)	
IMC	Alelo T	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
<b>&lt;25</b>	SI	25(32,5)	16(20,8)	36(46,8)	0,698
	NO	23(29,9)	13(16,9)	41(53,2)	
<b>25-30</b>	SI	26(27,4)	15(15,8)	54(56,8)	0,099
	NO	21(25,3)	24(28,9)	38(45,8)	
<b>&gt;30</b>	SI	19(32,2)	4(6,8)	36(61,0)	0,889
	NO	7(30,4)	1(4,3)	15(62,5)	
DE	Alelo T	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
<b>SI</b>	SI	40(37,7)	16(14,3)	56(50,0)	0,069
	NO	26(31,3)	23(27,7)	34(41,0)	
<b>NO</b>	SI	30(25,2)	19(16,0)	70(58,8)	0,977
	NO	25(25,0)	15(15,0)	60(60,0)	

#### 5.4.2 ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA HK2 CON EL RESULTADO DE LA BIOPSIA, ESTRATIFICADO POR LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS.

Se ha estudiado la asociación entre la proteína hK2 y el resultado de la biopsia de próstata, estratificado por las diferentes variables clínico-patológicas incluidas en el estudio (Tabla 5-38 y Tabla 5-39).

Se analiza la relación entre la concentración de la proteína hK2 y el resultado de la biopsia de próstata estratificada en función del volumen del tacto rectal. En los pacientes con próstatas con volumen II/IV se observó una relación estadísticamente significativa entre la proteína hK2 y la biopsia de próstata ( $p=0,031$ ). En este grupo, dentro de los pacientes con hK2 igual a 0,03 el 51,9% tienen un resultado negativo en la biopsia. En el rango de hK2 que va de 0,04-0,08 en varones con TR II/IV, el 68% fueron biopsias negativas. En el grupo de hK2 menor de 0,03 el 50% tienen biopsia positiva.

Con respecto a la relación entre la proteína hK2 y la biopsia estratificada por el consumo abundante de grasas, se observó significación estadística en el grupo de consumo abundante de grasas ( $p=0,007$ ). En este grupo dentro de los pacientes con hK2 igual a 0,03 es más frecuente tener una biopsia negativa (66,2%) y los < de 0,03 tienen más frecuentemente biopsia positiva.

Al analizar la relación de la proteína hK2 y el resultado de la biopsia en función del volumen prostático, se observó una relación que tendía a la significación estadística en el grupo de volumen prostático 56-74,6 cc ( $p=0,052$ ). En este grupo los pacientes con la proteína hK2 menor de 0,03 era mayor el porcentaje de pacientes con biopsia positiva (75%) frente al 0% de biopsias negativas. En el resto de cuartiles de proteínas, es más frecuente obtener un resultado negativo en la biopsia, destacando el 80% que se obtiene dentro del grupo de proteína comprendida entre 0,04 y 0,08.

Tabla 5-38. Análisis estratificado de la proteína hK2 y la biopsia de próstata en función de las variables clínico patológicas en los 419 pacientes. N(%)

TR	hK2	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
<b>I/IV</b>	<0,03	4(57,1)	2(28,6)	1(14,3)	<b>0,238</b>
	=0,03	9(31,0)	7(24,1)	13(44,8)	
	0,04-0,08	0	1(20,0)	4(80,0)	
	>0,08	5(29,4)	3(17,6)	9(52,9)	
<b>II/IV</b>	<0,03	4(50,0)	2(25,0)	2 (25,0)	<b>0,031</b>
	=0,03	56(29,6)	35(18,5)	98(51,9)	
	0,04-0,08	8(32,0)	0	17(68,0)	
	>0,08	29(37,2)	14(17,9)	35(44,9)	
<b>III/IV</b>	<0,03	0	0	1(100,0)	<b>0,335</b>
	=0,03	4(11,4)	5(14,3)	26(74,3)	
	0,04-0,08	2(28,6)	2(28,6)	3(42,9)	
	>0,08	0	1 (9,1)	10(90,9)	
<b>IV/IV</b>	<0,03				
	=0,03			1(100,0)	
	0,04-0,08				
	>0,08			1 (100,0)	
Consumo de grasas	hK2	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
SI	<0,03	2(66,7)	0	1(33,3)	<b>0,007</b>
	=0,03	13 (17,6)	12 (16,2)	49(66,2)	
	0,04-0,08	5 (35,7)	1 (7,1)	8(57,1)	
	>0,08	18( 47,)	8( 21,1)	12(31,6)	
NO	<0,03	6(46,2)	4(30,8)	13(23,1)	<b>0,091</b>
	=0,03	56(31,6)	34(19,2)	87(49,2)	
	0,04-0,08	5(21,7)	2 (8,7)	16(69,6)	
	>0,08	16(22,9)	11(15,7)	43(61,4)	
Volumen Prostático	hK2	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
<b>&lt;38 cc</b>	<0,03	3(42,9)	1 (14,3)	3(49,9)	<b>0,435</b>
	=0,03	26(44,8)	11 (19,0)	21(36,2)	
	0,04-0,08	4 (33,3)	1 (8,3)	7(58,3)	
	>0,08	17(63,0)	2 (7,4)	8(29,6)	
<b>38-55 cc</b>	<0,03	2(50,0)	2(50,0)	0	<b>0,165</b>
	=0,03	24(36,4)	10(15,2)	32(48,5)	
	0,04-0,08	3(37,5)	0	5(62,5)	
	>0,08	11(44,0)	3(12,0)	11(44,0)	
<b>56-74,6 cc</b>	<0,03	3 (75,0)	1 (25,0)	0	<b>0,052</b>
	=0,03	14(21,2)	14(21,2)	38(57,6)	
	0,04-0,08	1(20,0)	0	4(80,0)	
	>0,08	5(17,2)	10 (34,5)	14(48,3)	
<b>&gt;74,6 cc</b>	<0,03	0	0	1 (100)	<b>0,849</b>
	=0,03	5( 7,8)	12( 18,8)	47(73,4)	
	0,04-0,08	2(16,7)	2 (16,7)	8 (66,7)	
	>0,08	1(3,7)	4 (14,8)	22(81,5)	

Al estratificar en función del PSA libre, la relación entre la proteína hK2 y el resultado de biopsia fue significativa ( $p=0,034$ ) En el grupo de pacientes con PSA libre entre 1,12-1,74 los pacientes con una proteína menor de 0,03 el 66,7% tenían biopsia positiva, y ninguno tenía una biopsia negativa. Dentro de los que tienen una proteína = 0,03 el 62,7% tenían una biopsia negativa para malignidad. De igual modo los pacientes con una proteína comprendida entre 0,04 y 0,8 tenían el 72,7% de ellos una biopsia negativa para malignidad.

Se hizo un estudio de la relación entre la proteína en suero hK2 y el resultado de la biopsia de próstata estratificado por la densidad del PSA. Se observó una tendencia a la significación estadística dentro del grupo de pacientes con densidad entre 0,15 y 0,22 ( $p=0,059$ ). En este grupo los pacientes con una proteína hK2 menor de 0,03 no tienen en ningún caso biopsia negativa, obteniendo un 57,1% de pacientes con biopsia indeterminada y un 42,9% con biopsia positiva.

Cuando se analizó la relación entre la proteína hK2 y el resultado de la biopsia en función del cociente libre/total menor de 20% se observó una tendencia a la significación en el grupo de cociente libre/total mayor de 20% ( $p=0,08$ ). En este grupo los pacientes con niveles de proteína menores de 0,03 ninguno tenía biopsia positiva, siendo el 50% biopsia negativa y el 50% ASAP/PINAG. En el grupo de proteína comprendida entre 0,04 y 0,08 el 77,8% de los pacientes tenían una biopsia negativa mientras que solo un 22% la tenían positiva.

En el análisis estratificado del resto de las variables clínico-patológicas que se han estudiado para analizar la relación de la proteína hK2 y el resultado de la biopsia, no han logrado demostrar una relación estadísticamente significativa.

Tabla 5-39. Análisis estratificado de la proteína hK2 y la biopsia de próstata en función de las formas moleculares del PSA en los 419 pacientes. N (%)

PSA libre	hK2	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
<b>&lt; 0,7</b>	<0,03	2(50,0)	1 (25,0)	1(25,0)	<b>0,418</b>
	=0,03	17(28,3)	12 (20,0)	31(51,7)	
	0,04-0,08	2 (20,0)	1 (10,0)	7(70,0)	
	>0,08	12(42,9)	3 (7,1)	14(50,0)	
<b>0,8-1,11</b>	<0,03	1(20,0)	1(20,0)	3 (60,0)	<b>0,625</b>
	=0,03	18(20,6)	12(17,9)	37(55,2)	
	0,04-0,08	2(22,2)	0	7(77,8)	
	>0,08	7(29,2)	5(20,8)	12(50)	
<b>1,12-1,74</b>	<0,03	4 (66,7)	2 (33,3)	0	<b>0,034</b>
	=0,03	11(18,6)	11 (18,6)	37(62,7)	
	0,04-0,08	2(18,2)	1 (9,1)	8(72,7)	
	>0,08	7(28,0)	6 (24,0)	12(48,0)	
<b>&gt;1,74</b>	<0,03	1 (100,0)	0	0	<b>0,503</b>
	=0,03	22( 32,8)	12( 17,9)	33(49,0)	
	0,04-0,08	4(57,1)	1 (14,3)	2 (28,6)	
	>0,08	7(23,3)	6 (20,0)	17(56,7)	
Densidad PSA	hK2	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
<b>&lt;0,09</b>	<0,03	0	0	1(100,0)	<b>0,587</b>
	=0,03	5(8,2)	14(23,0)	42(68,9)	
	0,04-0,08	1 (12,5)	0	7(87,5)	
	>0,08	2(6,9)	6 (20,7)	21(72,4)	
<b>0,09-0,14</b>	<0,03	1(50,0)	0	1 (50,0)	<b>0,736</b>
	=0,03	11(17,7)	14(22,6)	37(59,7)	
	0,04-0,08	2(16,7)	1 (8,3)	9(75,0)	
	>0,08	5(17,9)	7(25,0)	16(57,1)	
<b>0,15-0,22</b>	<0,03	3 (42,9)	4 (57,1)	0	<b>0,059</b>
	=0,03	16(25,4)	15(23,8)	32(50,8)	
	0,04-0,08	3(27,3)	2 (18,2)	6(54,5)	
	>0,08	9(40,9)	3 (13,6)	10(45,5)	
<b>&gt;0,22</b>	<0,03	4 (66,7)	0	2 (33,3)	<b>0,753</b>
	=0,03	37( 54,4)	4( 5,9)	27(39,7)	
	0,04-0,08	4(66,7)	0	2 (33,3)	
	>0,08	18(62,1)	3 (10,3)	8(27,6)	
PSA L/T %	hK2	BIOPSIA +	ASAP/PINAG	BIOPSIA -	P
<b>&gt;20</b>	<0,03	0(0,0)	1(50,0)	1(50,0)	<b>0,089</b>
	=0,03	13(19,7)	39(59,1)	14(21,2)	
	0,04-0,08	2(22,2)	7(77,8)	0(0,0)	
	>0,08	2(7,1)	15(53,6)	11(39,3)	
<b>≤ 20</b>	<0,03	8(57,1)	3(21,4)	3(21,4)	<b>0,106</b>
	=0,03	55(29,4)	99(52,9)	33(17,6)	
	0,04-0,08	8(28,6)	17(60,7)	3(10,7)	
	>0,08	31(39,2)	40(50,6)	8(10,1)	

## 5.5 ANÁLISIS MULTIVARIABLE Y BENEFICIO NETO

Los factores de riesgo convencionales junto a los cocientes de hK2 con respecto al PSA total y PSA libre así como el polimorfismo C/T rs 198977, objeto de interés de este trabajo, se examinaron usando un modelo de regresión logística para evaluar su asociación con el resultado positivo para cáncer de la biopsia.

Se diseñó un modelo predictivo inicial al que denominamos “basal” que incluía tres variables: la edad, el PSA total y tacto rectal indurado o anómalo. Posteriormente se llevó a cabo un modelo “clínico” compuesto por cinco variables: las del modelo basal, más el volumen prostático y la historia familiar de cáncer de próstata. Estos dos modelos engloban las variables clínicas y analíticas que usamos en la práctica asistencial siendo el clínico un modelo más completo (Tabla 5-40).

Tras el desarrollo de estos modelos se desarrollaron otros tres modelos “experimentales” añadiendo al modelo clínico el cociente hK2/PSA total, la proteína hK2 y el polimorfismo C/T 198977 (Tabla 5-40).

En el modelo basal la edad no se asocia con el cáncer de próstata al obtener una OR =1. El PSA total se asoció positivamente con el cáncer de próstata (OR 1,05; IC 95% 1,02-1,09) al igual que la induración en el tacto rectal (OR 4,63; IC 95% 2,76-7,7). En el modelo clínico el volumen prostático era un factor protector (OR 0,96; IC 95% 0,94-0,97) y la historia de cáncer de próstata era factor de riesgo (OR 1,25; IC 95% 0,62-2,54).

Con respecto a los modelos experimentales en el primero de ellos que incluye el cociente hK2/PSA total, aparece con una OR de 0,97 con IC 95% 0,85-1,11, por lo que es un factor protector. En el modelo en el que se incluye la proteína hK2, se evidencia esta variable como un factor de riesgo para cáncer (OR 1,62; IC 95% 0,32-8,04), mientras que en el modelo que engloba el polimorfismo CT y CC, la odds ratio de esta variable es menor de 1 por lo que aparece como factor

protector. El polimorfismo TT, que es el alelo de riesgo, no se ha podido incluir por escaso número de pacientes.

Tabla 5-40. Análisis multivariable de la proteína, el polimorfismo rs 198977 y el cociente hK2/PSA total para predecir cáncer de próstata en la biopsia.

Modelos predictivos		Odds Ratio	IC 95%	p
Basal	Edad	1,00		0,045
	PSA total	1,05	1,02-1,09	<0,0001
	Induración	4,63	2,76-7,77	<0,0001
Clínico	Edad	1,00		0,002
	PSA total	1,09	1,05-1,14	<0,0001
	Induración	3,44	1,94-6,04	<0,0001
	Volumen (cc)	0,96	0,94-0,97	<0,0001
	Historia CP	1,25	0,62-2,54	0,52
Clínico + Hk2/PSA total	Edad	1,00		0,002
	PSA total	1,09	1,05-1,14	<0,0001
	Induración	3,44	1,94-6,04	<0,0001
	Volumen (cc)	0,96	0,94-0,97	<0,0001
	Historia CP	1,25	0,62-2,54	0,52
	hK2/PSA total	0,97	0,85-1,11	0,711
Clínico+ Hk2	Edad	1,00		0,002
	PSA total	1,09	1,05-1,14	<0,0001
	Induración	3,44	1,94-6,04	<0,0001
	Volumen (cc)	0,96	0,94-0,97	<0,0001
	Historia CP	1,25	0,62-2,54	0,52
	hK2	1,62	0,32-8,04	0,55
Clínico + hK2 + polimorfismo CC y CT	Edad	1,00		0,002
	PSA total	1,09	1,05-1,14	<0,0001
	Induración	3,44	1,94-6,04	<0,0001
	Volumen (cc)	0,96	0,94-0,97	<0,0001
	Historia CP	1,25	0,62-2,54	0,52
	hK2	1,62	0,32-8,04	0,55
	198977 C/C	0,71	0,31-1,60	0,53
	198977 C/T	0,77	0,34-1,74	0,41

Se llevó a cabo un análisis de la actuación de los modelos desarrollados mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC) y el análisis de las curvas ROC (Tabla 5-41). Para el modelo basal se obtuvo un AUC de 0,73 (IC 95% 0,67-0,97) En el modelo clínico se obtuvo una mejor capacidad diagnóstica para cáncer de próstata al conseguir un AUC de 0,83 (IC 95% 0,78-0,83) Los modelos experimentales no consiguen mejorar el modelo predictivo clínico al conseguir las mismas áreas bajo la curva.

Tabla 5-41. Capacidad predictiva (área bajo la curva) de los diferentes modelos.

Modelo predictor	AUC	IC 95%
Basal	0,73	0,67-0,79
Clínico	0,83	0,78-0,87
Clinico+hK2/PSA total	0,83	0,78-0,87
Clinico+hK2	0,83	0,78-0,87
Clinico+hK2+polimorfismo	0,83	0,78-0,87

Para el modelo clínico al igual que para los tres modelos experimentales, se aprecia en la curva ROC una sensibilidad del 65% y una especificidad del 85%, mientras que en el modelo basal la sensibilidad es del 50 % y la especificidad del 80% (Figura 5-1).

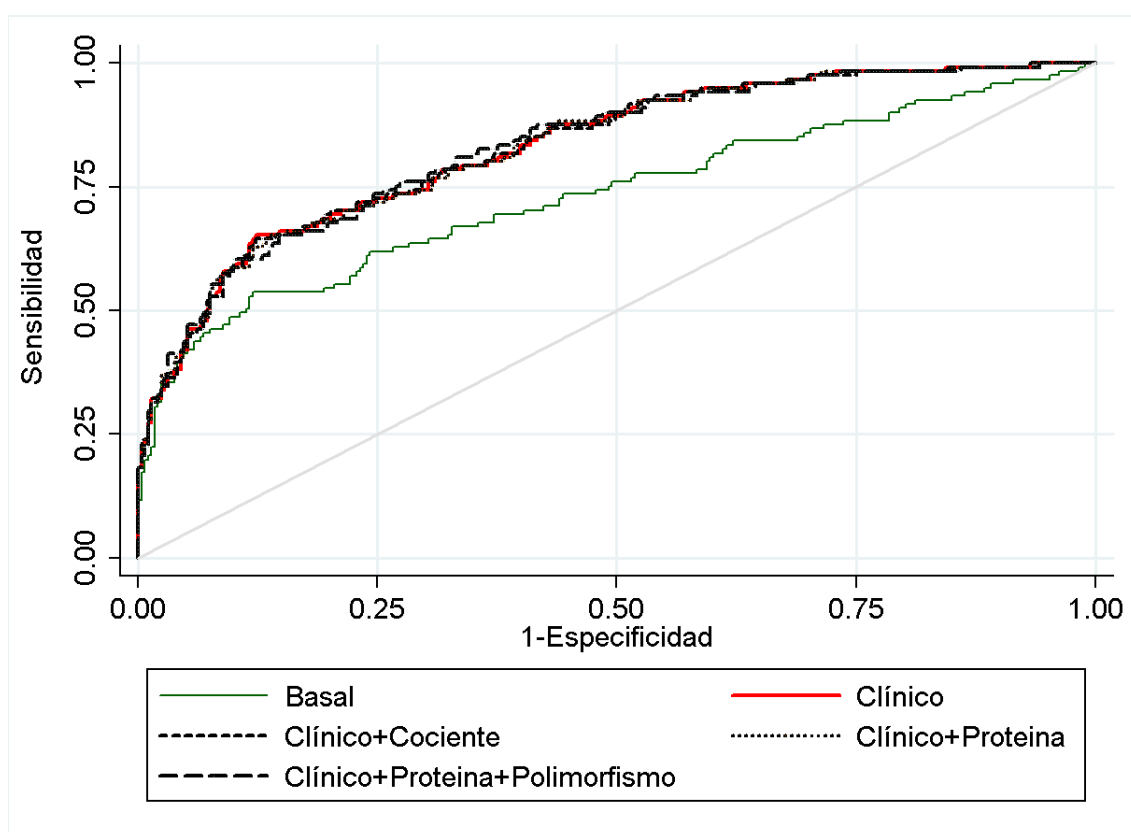


Figura 5-1. Curvas ROC de los diferentes modelos desarrollados en este estudio.

## BENEFICIO NETO

Los resultados de las curvas de decisión para los diferentes modelos se muestran en la Figura 5-2. Para los modelos clínico y experimentales el beneficio neto que se obtiene para una probabilidad de cáncer de próstata del 29% es mayor que el del modelo basal. Se calcula para el modelo clínico del presente estudio el número de biopsias innecesarias que podrían evitarse para diagnosticar el mismo número de cánceres. El resultado es de 47, con lo que con este modelo clínico y con los experimentales igualmente se conseguiría una reducción del 11,3% en biopsias de próstata innecesarias.

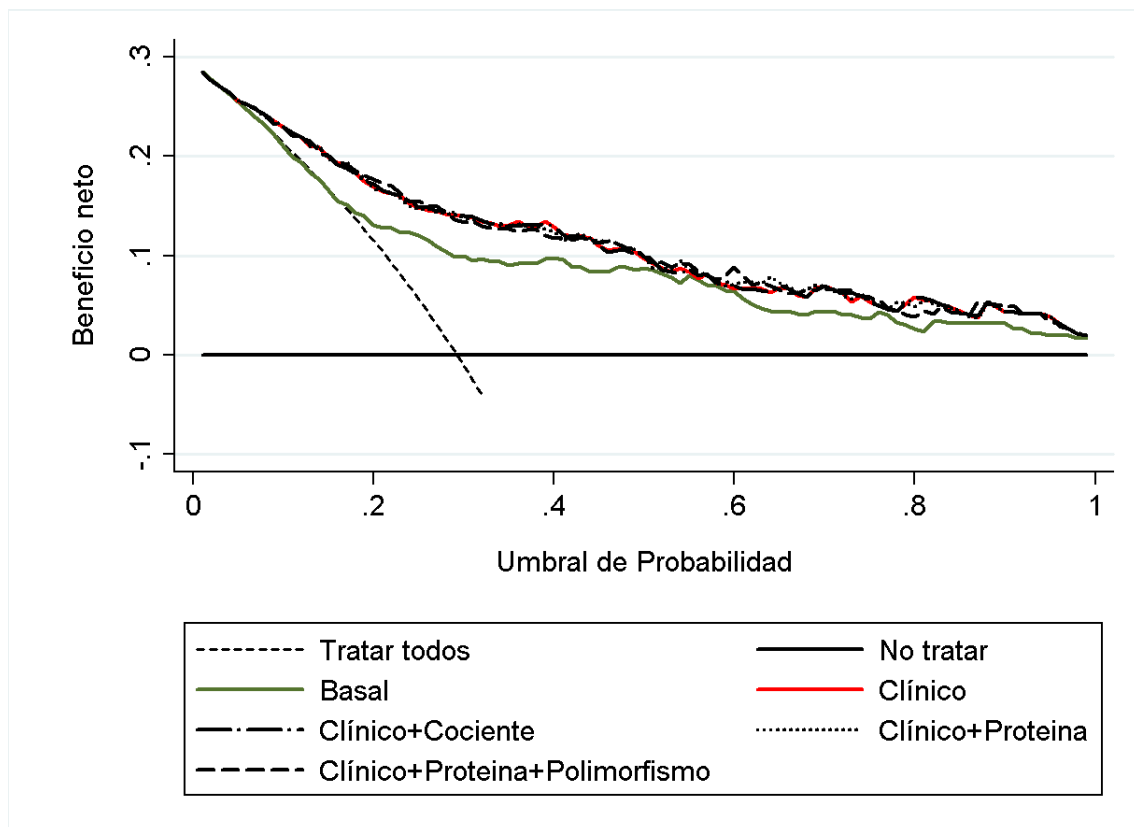


Figura 5-2. Curvas de decisión para los diferentes modelos



## 6 DISCUSIÓN

---



El cáncer de próstata es una de las enfermedades de mayor relevancia en el mundo por su incidencia y prevalencia. En Europa es el tumor sólido más común, y en España

Su incidencia se encuentra entre las más altas respecto del mundo (similar al resto de los países desarrollados, y en aumento) Este incremento podría explicarse por el envejecimiento de la población. En cambio, la tendencia de la mortalidad por cáncer de próstata en España ha sido disminuir, lo cual puede explicarse por los avances en el diagnóstico precoz y en terapias más eficaces. El cáncer de próstata, por tanto, es un problema de salud global prioritario, motivo por el cual se han desarrollado programas de cribado para el diagnóstico precoz.

Las herramientas clínicas más importantes para el diagnóstico del cáncer de próstata actualmente son el PSA, junto al tacto rectal y la biopsia de próstata. Debido a una extendida aplicación de estas herramientas, se ha producido un aumento del número de biopsias transrectales, lo que se asocia a una preocupación por evitar un excesivo número de procedimientos diagnósticos invasivos, que podrían resultar innecesarios.

En los últimos años, dada la falta de especificidad de los marcadores que se usan actualmente para el diagnóstico precoz del cáncer de próstata, la investigación se ha centrado en la identificación de biomarcadores que ayuden al diagnóstico temprano, estadificación y monitorización de la enfermedad.

Las líneas de investigación se han centrado en las formas moleculares del PSA con logros discretos en el aumento de la especificidad en el diagnóstico, así como en el estudio de la genética de las líneas germinales del cáncer de próstata debido al marcado componente hereditario de este tumor. Como la búsqueda de mutaciones comunes de líneas germinales hasta el momento ha

tenido éxito, las investigaciones se centran en los numerosos loci que se asocian con la susceptibilidad de padecer cáncer de próstata.

Varios estudios analizaron el papel de la glicoproteína hK2, proteasa sérica de la familia del PSA, en el diagnóstico de cáncer de próstata. Según refiere Becker et al, en combinación con el PSA libre y PSA total se puede obtener una mejor diferenciación entre HBP y CP<sup>131</sup>. En esta línea el grupo de Vickers y Lilja han desarrollado un modelo estadístico que podría predecir los resultados de la biopsia de próstata basado en la edad, el tacto rectal y un panel de cuatro calicreínas como marcadores - PSA total, PSA libre, PSA intacto y hK2, y así reducir el número de biopsias transrectales disminuyendo las complicaciones y el coste <sup>139</sup>.

Paralelamente se realizaron investigaciones sobre los posibles genes asociados con el cáncer de próstata. El grupo de trabajo de Nam et al identificó una asociación muy potente entre el polimorfismo C/T rs 198977 en el gen KLK2 y el cáncer de próstata, añadiendo los niveles de hK2 como factor independiente. Este estudio sugería que la habilidad de un marcador para predecir cáncer se incrementa si se conoce el polimorfismo presente en el gen y viceversa <sup>178,179</sup>. Observaron que el riesgo de padecer cáncer era mayor en los pacientes con el alelo T que los que tenían el alelo C. Además paradójicamente observaron que el alelo T se relacionaba con niveles de hK2 más bajos.

Todos los estudios que se han realizado en los últimos años sobre la detección precoz del cáncer de próstata suponen una gran evolución para la genética del cáncer de próstata, pero todavía hay que estudiar el modo en el que estos polimorfismos incrementen la precisión del PSA y otras calicreínas, como marcadores predictivos de cáncer de próstata<sup>188</sup>.

El objetivo principal de este trabajo es analizar la relación existente entre el polimorfismo C/T rs 198977 del gen KLK2, los niveles en sangre de la proteína

hK2 y las formas libre, total y ligada del PSA con el diagnóstico de adenocarcinoma de próstata en la biopsia transrectal.

En este estudio se ha determinado la frecuencia y el significado clínico del polimorfismo genético C/T rs 198977 del gen KLK2, y los niveles en sangre de la proteína glandular humana hK2 en una cohorte única prospectiva de 419 pacientes que cumplían criterios de realización de biopsia prostática según protocolo del Servicio de Urología del Hospital Universitario Severo Ochoa. También hemos analizado la relación de estos parámetros bioquímicos y genéticos con otras variables clínicas y moleculares utilizadas habitualmente para el cribado de cáncer de próstata y su manejo posterior en nuestro medio (edad, tacto rectal, factores de riesgo, tipo histológico, estadio clínico, hallazgos ecográficos y formas moleculares del PSA).

La presente discusión se estructura en varios bloques, y en todos ellos se resumen y analizan los resultados obtenidos, se valora su relevancia a la vista de los actuales conocimientos y estudios publicados al respecto y se discute su repercusión en la práctica clínica y manejo de los pacientes con sospecha de cáncer de próstata por cumplir criterios de cribado poblacional positivo para este tumor.

Se analizan inicialmente los resultados de la distribución de frecuencias de los factores de riesgo de los pacientes del estudio, así como los valores obtenidos del PSA y sus formas moleculares, la proteína hK2 y la distribución del polimorfismo genético C/T rs 198977 del gen KLK2, para poderlas contrastar y analizar con respecto a las poblaciones de los principales estudios sobre el tema.

Posteriormente se estudiará la asociación de la proteína hK2 y el polimorfismo genético C/T rs 198977 del gen KLK2 con el resultado de la biopsia de próstata. Más adelante y cumpliendo con todos los objetivos secundarios del estudio, se

analizará la asociación entre las variables genéticas y la proteína hK2 y formas moleculares del PSA, así como la creación de un modelo matemático predictivo del resultado de la biopsia prostática con las variables significativas del estudio.

## **6.1 DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE LOS FACTORES DE RIESGO DE CP, Y DEL POLIMORFISMO GENÉTICO C/T rs 198977 DEL GEN KLK2. CONCENTRACIONES EN SUERO DE LA PROTEÍNA HK2, PSA Y FORMAS MOLECULARES.**

Como en la mayoría de los estudios publicados hasta la fecha, en nuestra muestra la raza predominante es la caucásica (96,9% de los varones) En el único metaanálisis que existe sobre el polimorfismo genético C/T rs 198977 del gen KLK2 exponen como limitación importante del estudio que tan solo un 6,52% de los pacientes que participan son de raza asiática, siendo el resto de etnia caucásica, lo que implica una interpretación cautelosa de los resultados del trabajo<sup>186, 187</sup>.

Cuando a los pacientes se les hacía una encuesta previa a la biopsia y se les preguntaba sobre antecedentes personales y situación clínica actual, llama la atención que el porcentaje de varones con síntomas del tracto urinario inferior es del 54,7%. Así mismo el 47,3% de los pacientes presentaban disfunción eréctil en el momento de la biopsia. Un 69,6% presentaban o disfunción o STUI, y un 32,2% presentaban ambos. Este elevado porcentaje se debe fundamentalmente a que es por este motivo por el que los pacientes acuden a nuestras consultas de urología. Algo similar ocurre con el 47,3% de los pacientes que presentan disfunción eréctil. Es otro de los principales motivos de estudio urológico. Además los síntomas del tracto urinario inferior tales como la polaquiuria y flujo urinario débil pueden corresponder a síntomas de un tumor de próstata generalmente, localmente avanzado. Por este motivo en España se ha fomentado el cribado del cáncer de próstata en los pacientes con síntomas

del tracto urinario inferior, recomendado por el panel de expertos del instituto nacional del cáncer<sup>300</sup>

Con respecto al tipo de biopsia, al 93,1% de los pacientes se les realizó biopsia extendida (14 punciones) y al resto de los varones (6,9%) biopsias no extendidas. Se realizó biopsia extendida, es decir, añadiendo muestras laterales siguiendo las recomendaciones de las guías europeas de urología basadas en la revisión sistemática de Eichler que concluye que añadir muestras laterales al esquema clásico incrementa un 31% el rendimiento diagnóstico. Además este esquema se facilita en nuestro centro por el apoyo de una sedación realizada por un anestesista.

Tan solo se realiza biopsia octante en los pacientes en los que la sospecha y el diagnóstico de cáncer de próstata es muy alta (teniendo en cuenta el PSA y el TR) para disminuir el número de complicaciones. Esto se hace así para obtener material suficiente para anatomía patológica y para un diagnóstico definitivo con vistas a posteriores tratamientos.

En el presente trabajo la mayoría de los pacientes solo se han realizado una única biopsia (67,1%) En un 20,5% de los pacientes la biopsia que se realizaba era la segunda, y en un 8,8% la tercera biopsia. Los pacientes con un número mayor o igual a 4 biopsias se corresponden con un porcentaje menor de pacientes (3,6%) La mayoría se corresponden a pacientes con aumento reciente del PSA y/o tacto rectal sospechoso. Las repeticiones se aplican a pacientes con aumento progresivo del PSA, o diagnóstico de ASAP o PIN de alto grado en las biopsias previas.

En nuestro estudio, a diferencia de otros trabajos realizados previamente, los 419 pacientes se incluyen para realizar biopsia de próstata por cumplir criterios de inclusión del Servicio de Urología del Hospital Severo Ochoa, sin considerar si

era primera biopsia o sucesiva. Se realizaría previo a biopsiar, el análisis de la proteína hK2, PSA y polimorfismo genético C/T rs 198977.

Al revisar los estudios publicados recientemente sobre la proteína hK2, se observa la gran heterogeneidad que existe en las muestras de varones incluídas. En uno de los primeros estudios de Becker et al en el año 2000 <sup>130</sup> el grupo control estaba compuesto por 54 pacientes con HBP (biopsia previa negativa) y los casos correspondían a cáncer de próstata localizado (136 varones) y a cáncer de próstata localmente avanzado (57 pacientes).

En 2004 en el grupo de Vaisanen <sup>133</sup> la muestra consistía en 426 controles no caracterizados (varones sin alteraciones prostáticas ni PSA elevado) y 103 pacientes ya diagnosticados de cáncer de próstata.

En estos dos estudios iniciales el objetivo principal fue investigar el valor clínico de medir la proteína hK2 en el suero de los pacientes con hiperplasia benigna y cáncer de próstata para intentar demostrar que niveles elevados de la proteína se podrían asociar con cáncer de próstata.

Posteriormente se realizaron otros estudios donde la muestra consistía en pacientes ya diagnosticados de cáncer de próstata y que se iban a tratar mediante prostatectomía radical, y se evaluaba la predicción de riesgo de recurrencia <sup>134, 135,136</sup>. Todos estos estudios se centraron en el análisis de la proteína hK2 como predictor de recurrencia bioquímica, extensión extracapsular y bordes quirúrgicos positivos. El estudio de Wenske del año 2009 <sup>136</sup> es el que tiene el mayor tamaño muestral con 1382 varones intervenidos mediante prostatectomía radical.

En el año 2008 el grupo de Vickers y Lilja <sup>139</sup> realizó un estudio cuya cohorte eran 740 pacientes que correspondían a la primera vuelta del screening del brazo de Gotemburgo, Suecia [un centro del Estudio Aleatorio Europeo de Cáncer de Próstata (ERSPC)], todos ellos con PSA >3 ng/dl. Este estudio centrado en el

screening del cáncer de próstata excluye todos los pacientes con PSA < 3 ng/dl, lo que difiere de nuestra muestra en la que puede haber PSA < 3 ng/dl si tienen tacto rectal sospechoso.

En el año 2010 se replicó el estudio de Vickers <sup>140</sup> en una cohorte independiente de 2914 pacientes con PSA  $\geq$ 3ng/dl sin screening previo, a los que se les iba a realizar por primera vez una biopsia. Igualmente se excluyen pacientes con PSA < 3 y con segundas o ulteriores biopsias.

En ese mismo año se reprodujo el mismo estudio de forma independiente en el brazo de Francia, con un total de 629 pacientes con PSA  $\geq$ 3 ng/ml a los que se realizó cribado y biopsia por primera vez <sup>145</sup>.

Fue en estudios realizados en los años 2010 y 2011 donde se amplió el criterio de inclusión de la cohorte y se extendió a pacientes con cribado poblacional realizado anteriormente. Eran pacientes a los que no se les había realizado biopsia de próstata en una primer cribado para cáncer de próstata por PSA < 3ng/ml y que en un cribado posterior el PSA aumento <sup>141, 142,143, 144</sup>. Son cohortes con tamaños muestrales superiores al de este estudio por ser cohortes de estudios a nivel nacional. En el brazo de Rotterdam (Holanda) <sup>142</sup> se incluyen 1501 pacientes y en el de Gothenburg<sup>144</sup> (Suecia) 1241 pacientes.

En España no se ha realizado hasta la fecha ningún estudio de cribado poblacional sobre el que se haya medido la concentración en suero de la proteína hK2 para poder mejorar la especificidad de las pruebas diagnósticas del cáncer de próstata. La muestra de pacientes del estudio refleja una cohorte de pacientes de un área de la Comunidad de Madrid (Leganés) que se ajustan a los criterios de biopsia de las guías europeas por sospecha de cáncer de próstata.

Se ha obtenido un 28% de diagnóstico de cáncer de próstata, cifras similares a las que se refieren en otros trabajos de cribado poblacional con una cohorte similar, e incluso más elevado acorde con la incidencia elevada de cáncer de

próstata en España. En los estudios de Vickers realizados en las cohortes de Gothenburg <sup>141</sup> y de Rotterdam <sup>142</sup> el porcentaje de tumor obtenido es del 25,9% y del 25,8 % respectivamente. En el estudio de la cohorte francesa se obtuvo un 22,4% de cáncer de próstata <sup>145</sup>. En estos estudios no se especifica el estadio tumoral ni el grado de Gleason que se obtiene.

En nuestra muestra la mayoría de tumores diagnosticados son de bajo riesgo, teniendo un total de 65 pacientes (53,7%) con cáncer de próstata Gleason  $\leq 6$ , Gleason = 7 se obtiene en un total de 36 pacientes (29,7%), y el Gleason  $\geq 8$  corresponde a 20 pacientes (16,5%) Al comparar nuestros datos con los datos del registro nacional de cáncer de próstata <sup>9</sup> podemos comprobar que son muy similares. El 56,5% presentaron Gleason  $\leq 6$ , el 26,7% = 7 y el 16,8%  $> 7$ .

Si comparamos el Gleason de los pacientes de nuestra muestra que se obtiene en el momento de la biopsia, con el Gleason que se obtiene en el análisis de la pieza quirúrgica en el caso de que haya sido subsidiario a prostatectomía radical (35 pacientes operados), se observó que existían diferencias. La mayoría de los pacientes operados en la pieza de prostatectomía tenían un Gleason de 7 (54,2%), seguidos de un 40 % que tenían un Gleason de 6 o menor. Tan solo el 5,7% tenían un Gleason mayor o igual a 8. Estos resultados contrastan con los resultados del Gleason preoperatorio de los pacientes candidatos a cirugía en la biopsia. Un 58,3 % tenían un Gleason de 6, y un 41,6 % Gleason de 7. Lo que ha sucedido es que la biopsia de próstata suele infraestadiar el tumor y es en el momento del análisis de la pieza cuando se obtiene el Gleason real del cáncer de próstata.

Si vamos comparando el resto de los datos sobre los tumores de próstata obtenidos en este estudio con los resultados reflejados en el estudio de Cozar et al <sup>9</sup> realizado a nivel nacional, observamos diferencias y similitudes. Este estudio es un registro nacional de cáncer de próstata que incluye pacientes de 25 hospitales públicos. Son pacientes todos ellos con nuevo diagnóstico de cáncer

de próstata mediante confirmación histopatológica. Nuestros pacientes no tienen diagnóstico de cáncer sino criterios de sospecha que nos llevan a indicar una biopsia de próstata. Como se puede observar en la Tabla 6-1 una de las diferencias objetivables es que la disfunción eréctil como factor de riesgo en el trabajo nacional solo está presente en el 11% de los varones. En nuestra cohorte es más alta alcanzando el 54% de los pacientes con cáncer de próstata. Otra diferencia llamativa es la mediana de PSA; en el presente trabajo es de 14,4 ng/dl mientras que en el de Cozar et al es de 8 ng/dl; claramente más baja. En este trabajo se han excluido los valores de PSA por encima de 100 ng/dl pero los que estaban por debajo se han incluido, registrando 6 pacientes con PSA entre 50 y 100.

Si comparamos el número de cilindros que se obtienen, se observa que en el registro la gran mayoría son entre 8-10 cilindros, siendo tan solo un 4,3% en la Comunidad de Madrid los pacientes de los que se obtienen 11-14 cilindros. En el presente trabajo se ha realizado biopsia extendida (14 cilindros) en un 93,1% de los varones. Destacar que en un 37,2% de los pacientes de nuestra cohorte con cáncer de próstata tenían  $\geq$  de 7 cilindros afectados, con un 77,7% de afectación tumoral por muestra mayor del 11%. Es probable que si en vez de realizar biopsia extendida en nuestra muestra se hubiera realizado sextante u octante como describen en el registro nacional, quizás hubiéramos perdido nº de cilindros afectados y se hubieran diagnosticado menos tumores o de menor grado en la biopsia.

Con respecto a las similitudes las más relevantes son que el pronóstico tumoral (clasificación D'Amico) de los cánceres de próstata analizados es prácticamente el mismo. El más frecuente es el de bajo riesgo de progresión correspondiéndose a un 37,5% en el estudio nacional y un 35,5 % en esta trabajo.

Tabla 6-1. Comparación entre los datos del registro nacional de Cózar et al y la cohorte del trabajo

	Cozar et al <sup>9</sup> N=4087	Cohorte del trabajo N=419
<b>Edad media</b>	69 años	65,08 años
<b>STUI</b>	39,5%	54% (54,5% de los CP)
<b>Disfunción eréctil</b>	11%	47,3% (54% de los CP)
<b>Tacto rectal anómalo</b>	34,5%	24,8%
<b>Volumen glandular medio</b>	44,43cc	61,1cc
<b>Bajo riesgo progresión tumoral</b>	37,5%	35,5%
<b>Riesgo progresión tumoral intermedio</b>	23,1%	29,7%
<b>Alto riesgo progresión tumoral</b>	28,6%	29,7%
<b>Tumor localmente avanzado &gt;T3a (Comunidad de Madrid)</b>	4,58%	12,4%
<b>Tumor órgano confinado T1c-T2c</b>	95,42%	87,6%
<b>N+</b>	1,2%	9%
<b>M+</b>	4,71%	6,6%
<b>Nº cilindros biopsiados (Madrid) y cilindros afectados</b>	11-14 cilindros en un 4,3% de los varones	14 cilindros un 93,1% ≥7 cilindros afectados por tumor 37,2%

Con respecto al polimorfismo genético C/T rs 198977 del gen KLK2 nuestra muestra tiene una distribución bastante similar a la de los principales trabajos sobre el tema, con una proporción de genotipos TT algo más elevada (Tabla 6-2) Un 44,2% de los pacientes tenían un genotipo CC, el 42,7% eran CT y el 13,1% TT.

Uno de los primeros estudios que se realizaron sobre polimorfismos del gen KLK2 y la proteína glandular humana 2 (hK2) fue en el año 2003 por Nam et al.<sup>178</sup>. Los pacientes de este trabajo eran 1287 varones con PSA > 4 ng/ml o tacto rectal sospechoso a los que se les realizaba una biopsia de próstata por alguno

de estos criterios. En este trabajo el porcentaje mayoritario de los varones eran genotipo CC (55,0%), seguido de un 38,1% de CT y un 6,7% de TT.

En el año 2006 el mismo grupo realizo un trabajo sobre varios polimorfismos del gen KLK2 sobre un total de 1251 varones (645 casos probados con biopsia, 606 controles) <sup>177</sup>. En esta cohorte la proporción de CC era de 55,2%, 38,0% de CT y 6,7% de genotipo TT.

Ya en el año 2010 Klein et al <sup>185</sup> realizan un estudio de casos y controles realizado en dos fases independientes, la primera con un total de 1419 casos y 736 controles, y la segunda con 1267 casos y 901 controles, todos ellos de una base de datos sueca de casos y controles. En este trabajo en la primera fase el 58,0% de los varones tenían un genotipo CC, un 35,2% un genotipo CT y el 6,6 % un genotipo TT. En la segunda fase las proporciones eran muy similares con un 55,9% de CC, un 36,2% de CT y finalmente un 7,8% de TT.

Por ultimo con respecto a estudios de polimorfismos de KLK2 y proteína hK2 hay que destacar el ultimo que se ha publicado al respecto en el año 2014 por Satkunasivam et al del grupo de Nam <sup>187</sup> que aporta como dato añadido y claramente útil y relevante que se realizan las mediciones genéticas y proteicas sobre 941 varones con biopsia previa negativa realizada por PSA > 4ng/ml o TR anómalo, a los que prospectivamente se les ofrece una nueva biopsia de próstata. La proporción de genotipos CC en este trabajo fue del 47%, un 41% de CT y un 11% de TT.

Este último trabajo es el que presenta unas proporciones de genotipos que más se parecen a las obtenidas en nuestro trabajo. Además y más relevante es que junto al presente trabajo, es el único estudio en el que se incluyen varones a los que se les va a repetir la biopsia tras una previa negativa, escenario similar a los pacientes de nuestro estudio con segundas y terceras biopsias. Si se comprueba la utilidad de la proteína hK2 y del polimorfismo genético C/T rs 198977 del gen

KLK2 para predecir el resultado de la biopsia prostática, se conseguiría disminuir el número de biopsias innecesarias que es aun si cabe más importante en los pacientes a los que se les tiene que repetir la biopsia porque el PSA o el TR valorado por su urólogo lo aconsejan así.

Tabla 6-2. Distribución de los genotipos del gen KLK2 en las distintas publicaciones incluido este estudio por orden cronológico.

	CC	CT	TT
<b>Nam et al 2003</b> <sup>178</sup>	55,0%	38,1%	6,7%
<b>Nam et al 2006</b> <sup>177</sup>	55,2%	38,0%	6,7%
<b>Klein et al 2010 (1º)</b> <sup>185</sup>	58,0%	35,2%	6,6%
<b>Klein et al 2010 (2º)</b> <sup>185</sup>	55,9%	36,2%	7,8%
<b>Satkunasivam et al 2014</b> <sup>187</sup>	47%	41%	11%
<b>Este estudio, 2015</b>	44,2%	42,7%	13,1%

En esta investigación también se han calculado las medias del PSA, sus formas moleculares y la media de la proteína hk2, previo paso a realizar su asociación con el resultado de la biopsia y el resto de las variables. Todas ellas se detallaran en profundidad en el siguiente apartado en relación con el resultado de la biopsia, pero cabe destacar un dato sobre los demás. La media de la concentración de la proteína hk2 medida en suero en nuestro trabajo es menor que en los datos publicados.

Nuestra media global de hk2 (sin estratificar en función de la biopsia) es de 0,07 ng/ml. Al comparar con el estudio de Nam del 2003<sup>178</sup>, su media global es de 0,20 ng/dl. En el años 2006<sup>177</sup> este mismo grupo obtuvo una media de 0,37 ng/ml, y en el último estudio del 2014<sup>187</sup> la media de la proteína es de 0,23 ng/dl. Claramente nuestra media global sin estratificar en función del resultado de la biopsia es menor que las publicadas.

Con respecto al kit utilizado en este trabajo se contrasta con los usados en la literatura. El kit del estudio fue el único disponible en el mercado que se encontró. El trabajo de Steuber y cols. analiza tanto la hk2 total como la libre en

pacientes con prostatectomía radical, mediante anticuerpos monoclonales en fase sólida, que bloquean la proteína PSA y detectan hK2 en suero con un límite de detección de 0.003 ng/ml para la hK2 total y 0.01ng/ml para la hK2 libre, obteniendo un valor medio de hK2 total 0.08 ng/ml.<sup>134,135.</sup>

El kit ELISA utilizado en este estudio (SED 108 Hu Kit), determina tanto la forma activa de hK2 como el precursor a través de un anticuerpo monoclonal para dicha proteína. Nuestro kit indica que no se ha demostrado ninguna reactividad cruzada con otras calicreinas. El valor medio de HK2 en suero obtenido es 0.07 ng/ml, similar a los trabajos de Steuber. El 65% de los pacientes presentan un valor de hK2 menor o igual a 0,03ng/ml, que es el límite inferior de detección en este ensayo.

Aunque los valores medios de hK2 en las poblaciones con cáncer de próstata de otros estudios y la de este trabajo sean similares, la estratificación de los pacientes en los diferentes rangos de concentración de la proteína hK2 no muestran las asociaciones esperadas con la clínica del cáncer de próstata.

Vaisanen y cols. exponen que debido a que la cantidad de hK2 circulante en suero se encuentra en concentraciones muy bajas, los enzimoimmunoensayos utilizados para medir la proteína deben tener unos límites de detección muy bajos y una gran reproductibilidad. Así, para el rango crítico de PSA (2-10 ng/ml) los valores de hK2 estarían entre 0.02 y 0.5 ng/ml<sup>133.</sup>

Ante estos datos, nos planteamos para realizar más adelante la valoración de hK2 en suero con un ELISA de mayor sensibilidad o mediante el test de reciente implantación 4kScore.

El test 4kScore (OPKO Lab.) utiliza un kit de enzimoimmunoanálisis tipo sándwich para determinar la proteína hK2 mediante el uso de 5 anticuerpos monoclonales utilizados para bloquear la proteína PSA y para detectar HK2. El rango de detección de la proteína es de 0.022 - 8 ng/mL<sup>148.</sup> Este test da un

riesgo de cáncer de próstata según la combinación de cuatro calicreinas (PSA total, libre, intact y hk2) En este estudio no se ha medido el PSA intact por ser muy lábil y difícil de procesar.

### ***RELEVANCIA DEL ESTUDIO PARA LA PRACTICA CLÍNICA***

En este trabajo se ha hecho hincapié en la importancia de realizar un cribado poblacional sobre una cohorte que sea similar para todos los países donde se realiza screening para detectar cáncer de próstata. Dado que la incidencia de cáncer prostático en todos los países de Europa es parecida (con España de las más altas), todos los estudios que se lleven a cabo han de ser rigurosos y sistemáticos, para conseguir la mayor homogeneidad posible y así una aplicabilidad clínica de sus resultados.

Como se ha descrito antes tan solo existe publicado un estudio donde la cohorte se aproxime a la realidad clínica donde muchos pacientes son sometidos a biopsia prostática en repetidas ocasiones <sup>187</sup>. El interés clínico de nuestro estudio radica en la inclusión consecutiva de todos los pacientes que presentaban criterios de biopsia en el periodo de inclusión considerado y no se excluye ninguno por tener un PSA < de 4, o por haber tenido una biopsia previa negativa.

Un factor común a todos los estudios es la utilización de los criterios de biopsia aceptados en las guías de la Asociación Europea de Urología ampliamente estandarizados en nuestro país y en toda Europa.

Cabe destacar el elevado porcentaje de disfunción eréctil de los varones del estudio (47,3%) Tal vez se debe a que hay un elevado porcentaje de consultas por disfunción eréctil en la consulta de urología, que además se asocia con la edad de presentación de síntomas de obstrucción del TUI. Esto explicaría la petición de PSA como parte del estudio analítico solicitado. Por lo tanto habría que interpretar este resultado con cautela.

Es importante comentar que la media de la concentración de la proteína hK2 es menor que la publicada calculada globalmente sin estratificar en función del resultado de la biopsia. En el siguiente apartado se discutirá sobre los resultados en función de la estratificación. Podría ser útil el uso de kits de enzimoimmunoanálisis con niveles de detección más bajos para hK2 para así poder discriminar niveles inferiores a 0,03; a pesar de que, como se analizara más adelante los niveles bajos no parecen asociarse con cáncer de próstata.

## **6.2 RELACION DE LOS FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA, PROTEÍNA HK2, PSA Y FORMAS MOLECULARES, Y POLIMORFISMO GENÉTICO C/T rs 198977 DEL GEN *KLK2* CON EL RESULTADO DE LA BIOPSIA DE PROSTATA**

Comenzamos analizando los resultados correspondientes a la relación de los factores de riesgo de los varones del estudio con el resultado de la biopsia.

Tras el análisis de los resultados se obtuvo una asociación estadísticamente significativa en varios factores. El primero de ellos fue la edad. Como está ampliamente demostrado el cáncer de próstata tiene como uno de sus factores de riesgo más importantes el tener > de 65 años, y en este estudio así se ha confirmado, que los pacientes con más de 70 años tenían mayor riesgo de padecer cáncer de próstata <sup>15</sup>.

El IMC también ha sido estadísticamente significativo. En este trabajo los pacientes con cáncer de próstata tienen con más frecuencia un IMC entre 25-30 (38,8%), o menor de 25 (39,6%) Los pacientes con biopsia negativa tenían más frecuentemente (41,6%) un IMC de 25-30. En ninguno de los grupos existía relación con IMC > de 30. Sin embargo en la literatura según el Cancer Prevention Study se demostró que los pacientes con un IMC mayor de 32,5 presentaban mayor probabilidad de morir de cáncer de próstata <sup>300</sup>. En cambio

no se ha demostrado relación significativa con el consumo de grasas abundante. En nuestro trabajo no se cumple lo que algunos estudios sugieren que es que la ingesta de grasas saturadas se relaciona con un aumento de riesgo en la incidencia de cáncer de próstata de 2 a 3 veces, independientemente de la masa corporal. Esto parece ser que se debe al incremento de ácido alfa-linoleico como responsable de generar estrés oxidativo y daño en el DNA<sup>24</sup> pero no existen estudios concluyentes.

Con respecto a la presencia de disfunción eréctil se ha encontrado una relación estadísticamente significativa. En los pacientes con biopsia positiva tener disfunción eréctil fue más frecuente (54,5%) que no tenerla (45,5%) Este dato requiere cautela en su interpretación. De los pacientes mayores de 70 años en este estudio el 44,3% tenían biopsia positiva frente al 38,1% de los pacientes con biopsia negativa. Por lo tanto parece que los pacientes de mayor edad con cáncer de próstata tienen mayor posibilidad de padecer enfermedad de pequeño vaso como es la disfunción eréctil. A pesar de esto los porcentajes son muy similares.

La historia familiar de cáncer de próstata no ha presentado en este trabajo asociación significativa con el resultado de la biopsia. A pesar de que el cáncer de próstata en un tumor con un componente hereditario demostrado ampliamente y cuyo riesgo esta aceptado y demostrado en múltiples publicaciones <sup>9, 10, 11, 12, 13,14</sup>, tanto en nuestro estudio como en los que se han revisado en la literatura en relación con la proteína hK2 y polimorfismos genéticos <sup>177,178, 296</sup>, no se ha demostrado asociación significativa de la historia de cáncer de próstata con la biopsia de próstata.

Con respecto a la presencia de síntomas del tracto urinario inferior tampoco se demostró significación estadística. Tomando como referencia los estudios de Nam del 2003<sup>177</sup> y 2006 <sup>178</sup>, y el ultimo del 2014 <sup>187</sup>, tampoco obtienen una relación estadísticamente significativa en los dos primeros, pero casi se obtiene

en el trabajo del 2014 con una p de 0,067. Este resultado es interesante porque plantea la posibilidad de que no sea de interés realizar el cribado ante síntomas de obstrucción, siendo preciso guiarse por otros criterios diferentes como podría ser la edad.

La mayoría de los pacientes del estudio (95,9%) eran de raza caucásica por lo que no se puede establecer relación entre las otras etnias y el resultado de la biopsia. En cambio los datos publicados sobre la raza de los pacientes si arrojan significación estadística. Nam et al obtiene una  $p < 0,001$  y en el trabajo de Satkunasivam et al se obtiene una p de 0,07, casi significativa <sup>187</sup>. Esto probablemente sea debido a que en ambos trabajos tienen un porcentaje mayor de población negra (en torno al 15%), y menor pero destacable de población asiática (8%); siendo siempre una mayoría de varones blanco (80-90%).

Un factor en común que se ha obtenido en este trabajo con respecto a los publicados sobre el tema es la relación significativa del tacto rectal anormal con la biopsia positiva. Esto se corrobora en varios trabajos <sup>177,178</sup> mientras que en el último trabajo publicado por Satkunasivam et al no se encuentra asociación significativa <sup>187</sup>. Aun así dado la importancia documentada que tiene un tacto rectal anómalo, en este último trabajo se decidió incluir en su modelo predictivo por la relevancia clínica que tiene esta exploración.

Con respecto al volumen de la próstata los pacientes con una glándula  $< 38,3$  cc tenían con mayor frecuencia un resultado positivo en la biopsia y esta relación fue estadísticamente significativa. Esta ampliamente documentado y establecido que cuando se observa una elevación de PSA y el volumen prostático es muy elevado, el riesgo de padecer cáncer de próstata es menor, ya que una próstata sana también produce PSA por ser andrógeno dependiente. De ahí que muchas investigaciones se hayan enfocado en parámetros como la

densidad del PSA que se obtiene teniendo en cuenta el volumen glandular<sup>97, 98,99</sup>.

En esta investigación se ha calculado la concentración del PSA y sus formas moleculares y se ha analizado la asociación con el resultado de la biopsia. El PSA total, el índice PSA libre/total, PSA complex y densidad de PSA tienen una asociación significativa con el resultado de la biopsia. Esto está claramente demostrado ya que el PSA total es el biomarcador por excelencia para realizar el cribado poblacional de cáncer de próstata. El resto de isoformas del PSA igualmente se relacionan significativamente con el resultado de la biopsia salvo el PSA libre.

Cuando se comparan nuestros datos con los publicados en trabajos sobre el tema se observa que las medias de PSA y sus formas moleculares son diferentes a las obtenidas por nuestro grupo. En este trabajo se han identificado los pacientes que han obtenido biopsia indeterminada (ASAP/PINAG) por considerarlos relevantes clínicamente ya que un resultado así en la biopsia implica un seguimiento estrecho y en muchas ocasiones una rebiopsia. De hecho, en el trabajo del grupo de Nam del 2014<sup>187</sup> sobre pacientes con biopsia previa sin cáncer de próstata, establecen dentro de su nomograma predictivo un hallazgo en biopsia previa de ASAP/PINAG por ser estadísticamente significativo.

Como se pueden observar en la tabla comparativa Tabla 6-3, la media de PSA total de nuestro grupo es más elevada que la publicada por Nam et al<sup>178</sup> y Vickers et al.<sup>139, 140, 141,142</sup>. Nuestros datos son más altos tanto en las biopsias positivas como en las negativas. Lo mismo sucede con el PSA libre. Esto se debe posiblemente a que en estos trabajos el tipo de pacientes son algo diferentes. Si vemos las medias de PSA total en función del número de biopsia que se obtienen en este trabajo, se observa como la media de la primera biopsia es más elevada que las sucesivas (Tabla 6-4) En el trabajo de Nam<sup>178</sup> se tomaron

pacientes ya diagnosticados y controles con HBP, y en el trabajo de Vickers <sup>139</sup> se correspondían a una cohorte sueca donde todos son pacientes biopsiados por primera vez por elevación inicial del PSA, y en los trabajos del 2010 <sup>141</sup> se corresponden con replicaciones de un mismo modelo en diferentes poblaciones europeas.

Tabla 6-3. Comparación de la media del PSA total y formas moleculares de este trabajo, con datos publicados

	Este trabajo		Nam et al 2003 <sup>178</sup>		Vickers et al 2008 <sup>139</sup>		Vickers et al 2010 Gotheburg <sup>141</sup>		Vickers et al 2010 Rotterdam <sup>140, 142</sup>	
	B+	B-	B+	B-	B+	B-	B+	B-	B+	B-
<b>PSA Total</b>	14,4	8,6	7,4	3,4	5,8	4,21	3,51	3,51	4	3,8
<b>PSA Libre</b>	1,5	1,4	0,68	0,54	0,83	0,87	0,69	0,74	0,75	0,84
<b>PSA Lib /Tot %</b>	12,1%	16,9%	10%	20%	14,30%	20,60%				
<b>PSA Complex</b>	8,9	4,7								
<b>PSA Intacto</b>					0,43	0,37	0,39	0,39	0,53	0,49

Tabla 6-4. Medias de PSA total en función del número de biopsia y del resultado de ésta.

Este trabajo	B +	B -
<b>PSA total 1º biopsia</b>	16,26	7,09
<b>PSA total 2º biopsia</b>	8,77	9,35
<b>PSA total 3º biopsia</b>	15,12	13,29
<b>PSA total &gt;3º biopsia</b>	13,36	14,53

Nuestro trabajo tiene un factor común con todos los datos publicados: la relación significativa del resultado de la biopsia con el PSA total y las formas moleculares del PSA (densidad, ratio PSA libre/total) Como se puede observar igualmente en la tabla, los pacientes con un PSA total más elevado se corresponden con resultados positivos en la biopsia, y en eso todos los autores coinciden.

Un dato discrepante con respecto a lo publicado es que en esta investigación la relación del PSA libre con la biopsia no es significativa, siendo muy significativa en los trabajos publicados.

En este trabajo se ha calculado la concentración del PSA ligado o PSA complex en vez de calcular el PSA intacto. Esto ha sido así debido a la gran labilidad e inestabilidad del PSA intacto<sup>110</sup>, y a que el PSA complex según refiere Pearson <sup>115</sup> puede aumentar la especificidad del PSA total.

En una búsqueda incesante para intentar mejorar la especificidad del PSA en el diagnóstico precoz del cáncer de próstata se ha investigado en estos últimos años sobre la proteína glandular humana 2 (hK2) Numerosos estudios han demostrado que niveles elevados de hK2 en suero se asociaban con cáncer de próstata <sup>131, 132, 133,187</sup>.

En nuestro trabajo se observó una tendencia a la significación entre la proteína hK2 y el resultado de la biopsia ( $p=0,146$ ) Las mediciones se comprobaron para verificar que los resultados obtenidos eran los exactos. La forma de comprobar que el kit funcionó correctamente y que las mediciones son válidas fue mediante el uso de los estándares que se indicaban y detallaban en el kit. Todos los ELISAs, para cualquier proteína, vienen con una o varias muestras validadas y de concentración de la proteína problema conocida. A partir de esta muestra estándar, se realizaron varias diluciones seriadas, entre 6 y 8. Estas diluciones se trataron y procesaron como muestras, se siguió el mismo protocolo y en la

misma placa para que las variaciones que pudiera haber en el laboratorio de temperatura, humedad, pipeteo, ph también afectaran a los estándares.

Al terminar el proceso del enzimoimmunoanálisis, se midieron las absorbancias de todos los pocillos de la placa, indicando al lector de ELISAs las posiciones y concentraciones de los puntos de la curva, que van siempre por duplicado.

Tras la medición de la placa, los valores medios de los estándares se usaron para crear una curva tomando como valores las absorbancias (O.D) medidas y las concentraciones conocidas. Si la curva obtenida tenía un adecuado ajuste lineal, presentando un coeficiente de determinación ( $R^2$ )  $\geq 0,98$ , se dio por válida, dando por válidos así los resultados obtenidos en esa placa.

Tras todas las mediciones se comprobó que los pacientes con cáncer de próstata tenían una concentración más elevada que los varones con biopsia negativa. En la siguiente tabla se pueden observar las diferencias en las medias de las concentraciones de los principales estudios.

Tabla 6-5. Medias de hK2 en función de los diferentes trabajos

hK2 suero (ng/ml)	Biopsia +	Biopsia -
<b>Nam et al 2003</b> <sup>178</sup>	0,085	0,055(CP bajo riesgo) 0,54 (CP alto riesgo)
<b>Vickers et al 2008</b> <sup>139</sup>	0,076	0,046
<b>Vickers et al 2010 Gotheburg</b> <sup>141</sup>	0,055	0,046
<b>Vickers et al 2010 Rotterdam</b> <sup>140,142</sup>	0,073	0,059
<b>Satkunasivam et al 2014</b> <sup>187</sup>	0,246	0,228
<b>Este estudio 2015</b>	0,079	0,062

Como se puede comprobar en todos los trabajos las concentraciones séricas de la proteína hK2 son mayores en las biopsias con cáncer que en las biopsias negativas para malignidad. En las publicaciones esta diferencia de concentración se asocia a una mayor probabilidad de obtener cáncer de

próstata en la biopsia, pero en este trabajo no hemos podido reproducir estos resultados obteniendo una tendencia a la significación. Creemos que es debido a un tamaño muestral insuficiente ya que como se han descrito previamente las muestras de pacientes publicadas se corresponden a cohortes de estudios multicéntricos tomando pacientes de registros poblacionales ya caracterizados. De los trabajos publicados el que más se aproxima a nuestra cohorte en tamaño muestral es el estudio francés de 2010 con un total de 629 pacientes en los que se biopsiaron 370. Nuestro trabajo es una única cohorte de una Comunidad autónoma por lo que pensamos que es muy relevante dado que son 419 de un solo centro. Sería muy interesante poder ampliar la muestra e intentar reproducir estos resultados a nivel nacional.

Dado que los pacientes con cáncer de próstata tienen concentraciones de hK2 mayores que los varones sin cáncer, para intentar mejorar la especificidad del PSA total, se han llevado a cabo diferentes análisis estadísticos combinando los resultados de ambas proteínas.

Algunos grupos de trabajo publicaron que aunque los pacientes con cáncer de próstata y HBP no mostraron asociación estadísticamente significativa en los niveles de hK2, la relación de hK2 y el PSA libre (% hK2) aumentó la precisión sobre el porcentaje de PSA libre para discriminar cáncer de próstata y HBP en hombres con PSA entre 4- 10 ng / ml <sup>131</sup>. Según refería Becker et al <sup>131</sup>, en combinación con el PSA libre y PSA total se puede obtener una mejor diferenciación entre HBP y CP. Publicaron que el valor medio de hK2 y las razones hK2 / PSA libre y hK2 x PSA total / PSA libre eran significativamente superiores en CP comparados con HBP (Tabla 6-6).

Tabla 6-6. Comparación de los resultados de los cocientes de la hK2 con respecto al PSA libre y PSA total en función de la presencia o no de cáncer de próstata en la biopsia

Becker et al <sup>131</sup>	Biopsia +	Biopsia -
Hk2/PSA total %	1,3	1,6
Hk2/PSA libre %	13	8,8
Hk2xPSA total/PSA libre	0,91	0,34
Este estudio	Biopsia +	Biopsia -
Hk2/PSA total %	0,85	1,01
Hk2/PSA libre %	9,6	7,11
Hk2xPSA total/PSA libre	0,96	0,45

Nuestros resultados coinciden con los publicados. El valor medio de hK2 y las razones hK2 / PSA libre y hK2 x PSA total / PSA libre eran superiores en los varones con cáncer de próstata.

Al analizar la asociación entre los cocientes que relacionaban la proteína hK2 con el PSA total y el PSA libre se observó significación estadística para la razón hK2/ PSA total y hK2 x PSA total / PSA libre. De esta relación la más relevante para la clínica la obtuvo el cociente hK2/PSA total. Al estratificar por cuartiles cuando este cociente tenía un valor < 0,29 el 48,1% de los pacientes obtenían una biopsia positiva para cáncer con una  $p < 0,001$ . En cambio el cociente hK2 x PSA total / PSA libre obtenía igualmente significación estadística al estratificar por cuartiles ( $p=0,012$ ), sin encontrar relevancia para la práctica clínica, ya que cuando el cociente era > de 0,59 el porcentaje de pacientes que tenían biopsia negativa (44,6%) era muy similar al 41,6% de varones con biopsia positiva.

El cociente hK2/PSA libre en este estudio no se ha podido demostrar una relación estadísticamente significativa.

Parte del objetivo principal de este trabajo ha sido evaluar la relación existente entre el polimorfismo genético rs 198977 del gen KLK2 y el cáncer de próstata. En esta investigación no se ha encontrado asociación entre ambos. Numerosos estudios han mostrado que el alelo T correspondiente al alelo mutante en este

gen aumentaba el riesgo de cáncer de próstata <sup>177, 178, 185, 186,187</sup>. Además en algunos de estos trabajos se encontró una asociación fuertemente positiva entre el gen KLK2, los niveles séricos hK2, y el riesgo de cáncer de próstata.

Igualmente en esta investigación se analizó la relación de este polimorfismo con la proteína hK2 y no se observó significación estadística.

Con respecto a las concentraciones de hK2 en los diferentes genotipos se observó en este trabajo que el genotipo TT tenía la concentración sérica de hK2 menor de todos.

Como se observa en la siguiente tabla, este patrón proteico de hK2 se repite en varios estudios publicados.

*Tabla 6-7. Valores de hK2 en función del genotipo del paciente*

Hk2 ng/ml	CC	CT	TT
<b>Nam et al<sup>178</sup></b>	0,24	0,18	0,06
<b>Klein et al<sup>185</sup></b>	0,06	0,05	0,03
<b>Este estudio</b>	0,06	0,09	0,05

El grupo de Nam que comenzó con estos trabajos en el año 2003 refería que tanto los niveles séricos de hK2, como el del genotipo KLK2 predecían de forma independiente la presencia de cáncer de próstata, con el nivel de hK2 teniendo la asociación más fuerte. Fue en este estudio donde postulaban que el hecho de que el alelo T se asociara con cáncer de próstata y niveles bajos de hK2 podría deberse a la posibilidad de que el alelo T tuviera una predisposición inherente a producir menos proteína hK2 tanto en células malignas como benignas. Sin embargo demuestran que el alelo T por sí mismo se relaciona con el cáncer de próstata. <sup>177,178</sup>. Posteriormente en 2010 el grupo de Klein <sup>185</sup> reproduce en un estudio de casos y controles realizado en dos fases independientes la asociación ya demostrada por Nam et al en 2003 y 2006 del polimorfismo rs 198977 del gen KLK2 con el cáncer de próstata. Demuestran que la asociación entre este

polimorfismo y el riesgo de cáncer de próstata es mayor añadiendo los niveles de hk2 como factor independiente. Además concluyeron que el alelo T en rs 198977 se asociaba con un mayor riesgo de cáncer de próstata y una disminución de los niveles de hk2 en sangre junto con un porcentaje de PSA libre mayor.

En 2013 se publicó un metaanálisis con un total de seis estudios que sugería que el polimorfismo rs198977 de KLK2 se asociaba con la susceptibilidad de CaP en caucásicos y que el alelo T podría aumentar el riesgo de CaP en caucásicos<sup>186, 187</sup>.

El último estudio publicado sobre el tema <sup>187</sup> está de acuerdo con el riesgo para cáncer de próstata que muestra el alelo T pero en esta ocasión se asocia a niveles altos de hK2 y no a niveles bajos como había comentado Nam tanto en un trabajo del 2003 como del 2006.

En el metaanálisis <sup>186</sup> que se publicó aunando los 6 estudios más relevantes sobre este polimorfismo se sugería que existía heterogeneidad entre asiáticos y caucásicos puesto que parecía que era claro que el alelo T podría aumentar el cáncer de próstata pero esto no se cumplía en los asiáticos.

A la vista de estos resultados la hipótesis que se planteaba en este estudio relacionando el polimorfismo genético rs C/T 198977 con el cáncer prostático considerando los niveles séricos de la proteína hK2 como factor independiente, no se ha podido demostrar.

Sí que hemos podido verificar que los niveles de la proteína hK2 son menores en los pacientes con genotipo TT sin demostrar una asociación estadísticamente significativa. En nuestra hipótesis se planteaba que los niveles séricos de la proteína hK2 <0,05 ng/ml se relacionan con presencia de cáncer en aquellos pacientes con genotipo CT o TT rs 198977. Los valores medios de hk2 de este trabajo en los genotipos TT se han reproducido obteniendo un valor medio de 0,05 ng/dl.

## **RELEVANCIA PARA LA PRÁCTICA CLÍNICA**

El alelo T es menos frecuente en la población y aunque en la bibliografía parece claramente asociado con el riesgo de desarrollar cáncer de próstata, en este estudio no se ha podido demostrar tal relación. Posiblemente aumentando el tamaño muestral pudiéramos llegar a reproducir dicha asociación.

Es importante destacar que aunque los niveles de la proteína hk2 en suero son mayores en los pacientes con cáncer de próstata, cuando el genotipo del varón es TT los niveles son menores. Este dato es contradictorio ya que si aparentemente el alelo T se relaciona con la presencia de tumor prostático, debería de obtenerse en estos pacientes niveles elevados en suero de la proteína hk2.

Por tanto es importante conocer que aunque los niveles de hk2 en suero según nuestros resultados y lo publicado son mayores en cáncer de próstata independientemente de su genotipo, ante un paciente con niveles de hk2 bajos, si tiene un genotipo TT tiene más riesgo de desarrollar cáncer de próstata.

### **6.3 RELACIÓN DEL POLIMORFISMO C/T RS 198977, LOS ALELOS C Y T, Y LA PROTEÍNA HK2 CON LAS VARIABLES CLÍNICO PATOLÓGICAS DEL ESTUDIO**

Uno de los objetivos secundarios del presente estudio fue analizar la relación de los niveles de la proteína hk2 y el polimorfismo C/T rs198977 con los parámetros clínicos utilizados en la práctica habitual (edad, tacto rectal, tipo histológico, grado diferenciación, estadio clínico, hallazgos ecográficos y formas moleculares del PSA).

Así mismo como hipótesis se planteó que existía asociación entre el polimorfismo C/T rs 198977 y el % PSA libre/total.

## GENOTIPOS Y ALELOS

Se ha estudiado la relación existente entre el polimorfismo C/T rs 198977 y los alelos T y C, con las diferentes variables clínico patológicas.

Algunos de los estudios que se han publicado sobre la relación del polimorfismo C/T rs 198977 con el resultado de la biopsia incluían a la proteína hK2 como factor independiente, y otros analizaban la relación de este polimorfismo con las formas moleculares del PSA<sup>178, 185</sup>.

En ninguno se analizaba la asociación del polimorfismo con variables clínico patológicas distintas del PSA y de la Hk2.

Como el último de los objetivos secundarios de este estudio es crear un modelo matemático predictivo del resultado de la biopsia prostática transrectal, en pacientes con criterio de biopsia para cáncer de próstata, combinando 4 calicreínas: PSA libre, total, ligado y hK2, además de la edad y el tacto rectal, se decidió llevar a cabo un análisis pormenorizado de las variables clínico patológicas que pudieran relacionarse con la proteína Hk2 y con el polimorfismo.

Al analizar la relación entre el IMC y los genotipos (CC, CT, TT) del *gen KLK2*, se observó que existía una asociación estadísticamente significativa ( $p=0,002$ ) Según los resultados obtenidos los pacientes con un IMC < 25 presentaban con más frecuencia un genotipo CC (50,3%).

Con respecto al tacto rectal también ha demostrado una relación significativa con los genotipos del *gen KLK2* ( $p=0,004$ ) En los pacientes con un tacto rectal grado II/IV fue más frecuente tener un genotipo CC (47,8%) mientras que en los pacientes con un tacto rectal grado III fue más frecuente tener un genotipo CT (60%).

Estos hallazgos no parecen tener relevancia clínica en la práctica asistencial habitual ya que en el genotipo CT se combinan los alelos T y C lo que no permite apreciar una clara relación entre el volumen prostático estimado por tacto rectal y el genotipo del paciente

Se analizó igualmente la relación de los genotipos con la presencia de síntomas de tracto urinario (STUI) Dentro de los pacientes con síntomas de llenado o vaciado del tracto urinario inferior fue significativamente más frecuente tener un genotipo CC (51%) que CT (38,4%) o TT (15,4%), ( $p=0,004$ ) Posiblemente esto se deba a que como se ha explicado antes el genotipo CC es el más frecuente y la presencia de STUI en la muestra del estudio es alta (54,7% )(ver página 10 discusión).

Cuando se llevó a cabo el análisis de la relación entre la hK2 y el polimorfismo C/T rs 198977 no se demostró una asociación estadísticamente significativa. A pesar de que existen varios trabajos publicados que afirman que el polimorfismo rs 198977 y los niveles de hK2 en sangre se relacionan y que en combinación son altamente predictores de cáncer de próstata, no hemos podido demostrar esta asociación.<sup>177,178, 185,187.</sup>

Este resultado posiblemente se deba a que en estos trabajos salvo el ultimo de Nam et al del año 2014, como se ha comentado previamente, los pacientes eran varones en algunos casos ya diagnosticados previamente de cáncer de próstata y en otros correspondían a un primer cribaje para cáncer de próstata. En el trabajo de Nam et al<sup>187</sup> incluían 941 pacientes a los que se les repitió la biopsia por PSA > 4ng/dl o tacto rectal sospechoso tras una biopsia previa negativa.

Por lo tanto a la vista de nuestros resultados posiblemente si aumentáramos la muestra al tratarse de genes y screening se conseguiría demostrar los mismos resultados de la literatura que afirman esta asociación.

Al llevar a cabo el análisis del polimorfismo rs 198977 con las formas moleculares del PSA (PSA libre y ratio libre/total) no se demostró asociación significativa por lo que no se ha podido demostrar la hipótesis que se planteaba en el trabajo. En el estudio de Klein del año 2010 se demostraba una asociación positiva entre el polimorfismo rs 198977 y el cociente PSA libre/PSA total <sup>185</sup>. Esto se debe posiblemente a que este ratio se relaciona muy fuertemente con la presencia de cáncer de próstata, y el polimorfismo genético no. Ningún grupo de trabajo a parte de Klein ha demostrado esta relación.

Se realizó el mismo análisis con los alelos por separado.

Con respecto al alelo C se obtuvo una asociación estadísticamente significativa con respecto a la presencia de disfunción eréctil y al consumo abundante de grasas. No hemos encontrado ningún estudio en la literatura revisada que obtenga estos mismos resultados.

En el análisis de la relación entre la presencia del alelo T y los grupos de IMC, se observó que fue significativamente más frecuente que dentro de los pacientes con un IMC > de 30 los pacientes tuvieran el alelo T (71,4%), frente al 28,5% que no lo tenían. Dentro del grupo de pacientes con IMC de 25-30 fue más frecuente tener el alelo T (53,6%) que no tenerlo, ( $p=0,003$ ) Por tanto, observamos en nuestro estudio que con mayor IMC es más frecuente poseer el alelo T.

Se observó relación estadísticamente significativa en el estudio de la relación entre los grados de tacto rectal y la presencia del alelo T ( $p= 0,008$ ) Dentro de los pacientes con un tacto rectal grado III/IV es más frecuente tener el alelo T (76,3%) lo que implica que las próstatas más grandes tienden a asociarse con el alelo T. Estos datos concuerdan con los obtenidos previamente en el análisis del genotipo que demostraba que los pacientes con un tacto rectal grado III fue más frecuente tener un genotipo CT (60%), en el cual está englobado el alelo T.

Con respecto a los síntomas del tracto urinario se demostró que los pacientes con alelo T tenían menos sintomatología que los que no lo tenían. En cualquier caso parece que los pacientes con alelo T pueden tener próstatas de mayor tamaño y menos sintomatología. Habría que hacer estudios en este sentido para demostrar si esto refleja un hallazgo clínico real.

La HTA y el volumen prostático obtuvieron una débil tendencia a la significación en su análisis con el alelo T. No hemos encontrado datos en la literatura que apoyen este hallazgo.

Al analizar el resto de variables y las formas moleculares del PSA para ver cómo se relacionaban con este alelo no se pudo demostrar una asociación significativa.

Más adelante en la discusión de este trabajo se estratificara esta asociación en función del resultado de la biopsia para evaluar su relación.

### ***PROTEINA HK2***

La relación entre la concentración de hK2 en suero y la presencia de margen quirúrgico positivo en los pacientes sometidos a prostatectomía radical tiene tendencia a ser significativa ( $p=0,071$ ) En el grupo de pacientes con una concentración sérica de hK2 entre 0,04 y 0,08, un 66,7 % tenían margen quirúrgico positivo y en un 53,8% de los casos tenían margen positivo los pacientes con una concentración de hK2 > 0,8 ng/dl. Parece relevante clínicamente que a mayor concentración de hK2, mayor probabilidad de márgenes positivos.

Estos resultados concuerdan con los datos publicados al respecto. En el año 2007 el grupo de Lilja <sup>134</sup> midió en suero la concentración de hK2 en 867 pacientes sometidos a prostatectomía radical. Concluyeron que valores de hK2 más elevados se asociaban con cánceres más agresivos, e identificaban a la

proteína hK2 como el predictor más fuerte de extensión extracapsular e invasión de vesículas seminales comparándolo con el PSA libre y el total.

Unos años más tarde este mismo grupo reproduce en 1382 pacientes operados mediante prostatectomía radical los resultados obtenidos unos años antes, añadiendo un dato. Afirman que niveles elevados de hK2 son más elevados en tumores localmente avanzados y que añadir la proteína hK2 en los modelos de predicción de riesgo de recidiva de cáncer de próstata mejora claramente esa predicción sobre todo si el PSA es < de 10 ng/dl<sup>136</sup>.

En el año 2013 el mismo grupo evaluó sobre 392 pacientes pertenecientes al brazo de Rotterdam del estudio ERSPC, la capacidad que tenía un panel de cuatro calicreinas (PSA total, PSA libre, PSA intacto y hK2) para distinguir entre un tumor insignificante o un tumor agresivo de próstata. Concluyeron que el panel que incluía la proteína hK2 conseguía un área bajo la curva de 0,84 frente al 0,81 que conseguía el panel convencional y por lo tanto mejoraba la capacidad de predecir un tumor insignificante o agresivo en la pieza de prostatectomía radical<sup>147</sup>.

En el resto de las variables clínico patológicas del estudio, no se pudo demostrar asociación estadísticamente significativa con los niveles de la proteína hK2 en suero.

### ***HK2/PSA TOTAL***

Se llevó a cabo el análisis de la relación entre la proteína hK2/PSA total con las variables clínico patológicas del estudio.

Cabe destacar de este análisis el resultado obtenido por el cociente hK2/PSA total < 0,29. En estos valores este cociente se asocia significativamente con numerosas variables relacionadas con tumores de próstata de peor pronóstico que se detallan a continuación.

Se analizó la relación existente entre la induración en el tacto rectal y el cociente hK2 /PSA total. Se observó una asociación estadísticamente significativa entre ambas variables ( $p=0,010$ ) En el cuartil de cociente hK2 /PSA total  $< 0,29$  es más frecuente tener induración (34,6%) que en el resto de los cuartiles. Aunque estos resultados son prometedores, no pueden ser aplicados a la clínica porque en el cuartil cociente  $>$  de 1,07 en un 28,8% de los pacientes se encuentra induración; porcentaje similar al del cociente  $< 0,29$ .

Con respecto a la relación existente entre los grupos de riesgo en función de la clasificación de D'Amico y el cociente hK2 /PSA total se observó una asociación estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) En el cuartil de cociente hK2 /PSA total  $< 0,29$  es más frecuente tener un tumor de alto riesgo que de riesgo intermedio o bajo (56%) En cambio en el cuartil cociente hK2 /PSA total  $> 1,07$  es más frecuente tener un riesgo tumoral bajo (52,2%).

Cuando se analiza la asociación entre la presencia de asimetría en el tacto rectal y el cociente hK2 /PSA total se puede observar que es significativamente más frecuente la presencia de asimetría en el cuartil cociente hK2 /PSA total  $< 0,29$  (25%) que en el resto de grupos ( $p=0,001$ ).

Con respecto al borramiento y su relación con el cociente hK2 /PSA total se evidencio un asociación estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) Tan solo 20 pacientes presentaban al tacto una próstata con surco borrado pero 14 de ellas tenían un cociente  $< 0,29$ .

Destacar igualmente la relación con el tacto rectal de consistencia fibroelástica. En el cuartil cociente  $< 0,29$  el porcentaje de próstata no fibroelástica era más frecuente (36,5%) que en el resto de subgrupos.

Otro dato analizado fue la presencia de nódulo sospechoso. En el grupo de pacientes con nódulo sospechoso presente es significativamente más frecuente

tener un cociente hK2 /PSA total < 0,29 (39,4%); p=0,014) que el resto de los cuartiles.

Dentro del grupo de mayor afectación tumoral (> = 7 cilindros), la mayoría de los pacientes tenían un cociente hK2 /PSA total < de 0,29 (N 43, 45,7%; p=0,027) En el grupo de afectación tumoral entre el 6-10% es menos frecuente que tengan un cociente comprendido entre 0,53-1,06 (0%).

En este análisis que se desarrolló la edad también mostro asociación estadísticamente significativa con el cocientes hK2 /PSA total (p< 0,001) Se observó que en el grupo de pacientes con más de 70 años es más frecuente tener un cociente < de 0,29.

Con respecto al grado de Gleason se observó que en el grupo de pacientes con Gleason  $\geq$  a 8 era más frecuente tener un cociente < de 0,29 (70%: 14 de 20 totales) que cualquier otro cocientes.

Con respecto al estadio clínico del tumor se observó significación estadística en su relación con el cociente hK2 /PSA total (p <0,001) En el grupo de mayor estadio clínico (> T3a) es más frecuente (N =14; 93,3%) tener un cociente hK2 /PSA total < de 0,29.

Todos los resultados anteriores indican que el cociente hK2/PSA total se relaciona con tumores de próstata locamente avanzados (borramiento, induración, nódulo palpable al tacto, estadio clínico > T3a), de peor pronóstico al asociarse con el riesgo elevado de D'Amico, con mayor Gleason y afectación extensa de los cilindros prostáticos. Este hallazgo permitiría identificar al grupo de pacientes de peor pronóstico que exige un diagnóstico más precoz para poder ofrecerle un tratamiento más eficaz.

El único estudio que relaciona este cociente con el diagnóstico de cáncer de próstata es el de Becker et al<sup>130, 131</sup>. En él analizan la capacidad que tienen los

cocientes hK2/PSA total, hK2/PSA libre y hK2xPSA total/libre para discriminar entre biopsia positiva y negativa. En su trabajo el que mejor lo predecía era el cociente hK2xPSA total/libre ( $p < 0,001$ ), a diferencia de nuestro trabajo en el que la relación con cáncer de próstata la obtuvo el cociente hK2/PSA total  $< 0,29$ .

En el estudio de Becker et al <sup>130,131</sup> cuando estudian la capacidad que tienen estos cocientes para discriminar entre tumor órgano confinado, invasión capsular e invasión de las vesículas seminales no demostraron que existiera asociación estadísticamente significativa entre ellos.

En este trabajo se ha encontrado relación con el riesgo alto de D'Amico, con un Gleason  $> 8$ , una mayor afectación tumoral y un estadio clínico  $>T3a$ , lo que consideramos claramente relevante para la práctica clínica ya que nos permite identificar los pacientes que tiene más probabilidad de padecer un cáncer de próstata de mayor riesgo y peor pronóstico, en los que es preciso ser más agresivo para obtener un diagnóstico precoz. En el resto de los casos, como la probabilidad de tener un tumor de mal pronóstico es menor, podríamos ser más conservadores a la hora de indicar la biopsia.

### ***HK2/PSA LIBRE***

Se llevó a cabo igualmente el análisis de la relación entre el cociente hK2/PSA libre con las variables clínico patológicas del estudio.

A continuación se detallan las variables del estudio que se han asociado significativamente con un cociente hK2/PSA libre  $<$  de 2,02. Se han obtenido resultados muy similares a los obtenidos por el cociente hK2/PSA total. Se ha evidenciado en menor medida asociación con ciertas variables clínicas relacionadas con tumores de próstata localmente avanzados.

La asociación entre los grupos de riesgo según D'Amico y el cociente hK2/PSA libre es una relación estadísticamente significativa al igual que en el caso del cociente hK2/PSA total, ( $p=0,001$ ) Dentro del grupo del cociente hK2/PSA libre < de 2,02 es más frecuente tener un cáncer de próstata de alto riesgo (57,1%) que de bajo riesgo o riesgo intermedio.

Con respecto al borramiento y la induración en el tacto rectal, su relación con el cociente hK2 /PSA libre evidencio un asociación estadísticamente significativa en ambos casos. En los pacientes con tacto rectal borrado o indurado es más frecuente tener un cociente hK2 /PSA libre < de 2.02 ( $p= 0,009$ ).

Se analiza la asociación entre presentar síntomas del tracto urinario inferior y el cociente hK2 /PSA libre. Esta relación muestra que es significativamente más frecuente en el grupo de pacientes con un cociente hK2 /PSA libre < de 2.02 tener síntomas de tracto urinario inferior (67,0%) ( $p= 0,019$ ) Este dato posiblemente se deba al elevado porcentaje de pacientes en este estudio que presentan síntomas del tracto urinario inferior.

La relación con el número de biopsia en el momento del estudio y el cociente hK2 /PSA libre mostro que era más frecuente en el grupo de pacientes con tercera biopsia de próstata tener un cociente hK2 /PSA libre < de 2,02 ( $N=18, 48,6\%$ ) Este dato concuerda con el resultado obtenido con el cociente hK2/PSA total. Los pacientes a los que se les biopsiaba por tercera vez, 20 de ellos (54,0%) correspondían a cocientes < de 0,29 ng/dl. Posiblemente estos resultados se deban a pacientes con aumentos sucesivos de PSA total y libre que precisan rebiopsiar. Estos resultados inciden en la importancia de estos índices para tomar la decisión de realizar biopsias sucesivas.

En este análisis que se desarrolló la edad también mostro asociación estadísticamente significativa con el cociente hK2 /PSA libre ( $p <0,001$ ) Se observó en el grupo de pacientes con más de 70 años que es más frecuente

tener un cociente < de 2,02 frente al resto de cuartiles de cocientes (42 pacientes de 98 que tienen > de 70 años, lo que supone un 42,8% de estos).

El único dato que va en contra de la asociación del cociente HK2/PSA libre < de 2,02 con tumores de próstata de peor riesgo es que en el cuartil cociente > 7,76 es más frecuente tener márgenes positivos que no tenerlos (53,8%) Conforme va aumentando el cociente hK2 /PSA libre, va aumentando la posibilidad de márgenes quirúrgicos positivos ( $p=0,089$ ) pudiendo demostrar tan solo una tendencia a la significación estadística.

Comparando nuestros resultados con los datos publicados por Becker et al <sup>130,131</sup>, este cociente es el que menos discrimina entre resultado positivo y negativo de la biopsia aunque en su trabajo tiene una asociación positiva ( $p=0,049$ ) Igualmente analiza si este cociente es capaz de asociarse con invasión capsular, invasión de las vesículas seminales y tumor órgano confinado y no pudo demostrar asociación estadísticamente significativa.

En este trabajo no se ha podido demostrar su relación con la presencia de cáncer pero en cambio sí se relaciona con un riesgo alto de D'Amico y con anormalidad en el tacto rectal. La interpretación clínica de los resultados obtenidos queda limitada a los criterios de mal pronóstico en los pacientes con diagnóstico de cáncer. No se puede inferir que este parámetro tenga utilidad para mejorar los criterios de indicación de biopsia prostática.

#### ***HK2XPSA TOTAL/LIBRE***

La asociación entre los grupos de riesgo según D'Amico y la combinación hK2x PSA total/PSA libre es una relación estadísticamente significativa ( $p= 0,006$ ) El 37% de los pacientes con un cociente >0,59 tienen un riesgo alto según D'Amico. Estos varones corresponden al 44,1% de todos los pacientes que tienen un riesgo elevado en los grupos pronósticos de cáncer de próstata.

Así mismo se estudió la asociación entre el volumen de la próstata. Esta relación mostro que era significativamente más frecuente tener un volumen prostático > de 74,6 cc si el paciente tenía la combinación hK2x PSA total/PSA libre < de 0,16 (39,4%;  $p < 0,001$ ) Asimismo era más frecuente dentro del grupo del índice > de 0,59 tener un volumen prostático menor de 38,3 cc.

Con respecto al porcentaje de afectación tumoral en relación a la combinación hK2x PSA total/PSA libre existe una tendencia a la significación estadística con una  $p=0,060$  muy cercana a 0,05. Es clínicamente relevante que dentro del subgrupo de pacientes con índice mayor de 0,59 el 88,1 % de estos tengan afectación tumoral > del 10%, mientras en los demás subgrupos el porcentaje es menor y está distribuido entre el 5 y el 10% de afectación tumoral.

Con respecto al grado de Gleason al igual que con el porcentaje de afectación tumoral existe una tendencia a la significación estadística con  $p$  de 0,065. Dentro de los pacientes con un Gleason  $\geq 8$  el 47,3% ( $N=9$ ) se corresponden a una combinación hK2x PSA total/PSA libre > de 0,59.

Estos datos se relacionan débilmente con el hecho de que un cociente hK2x PSA total/PSA libre > de 0,59 se asocie con tumores de peor pronóstico ya que solo se obtiene significación estadística con el riesgo elevado de la clasificación de D'Amico.

En este trabajo al igual que los resultados del trabajo de Becker <sup>130</sup>, el cociente hK2x PSA total/PSA libre se relaciona significativamente con un resultado positivo en la biopsia.

Tal y como se ha explicado con anterioridad en el trabajo de Becker este cociente tampoco discriminaba bien entre tumor de próstata órgano confinado y locamente avanzado.

Parece por lo tanto relevante clínicamente que si los cocientes hK2/PSA total y hK2x PSA total/PSA libre se asocian en este trabajo con un resultado de biopsia positiva, hemos de tener en cuenta el resultado estadísticamente significativo que obtienen al combinarlos con variables clínicas asociadas a peor pronóstico en el cáncer de próstata. Esto implicaría que si se obtiene un resultado que se asocie con peor pronóstico en la enfermedad, a ese paciente habría que ofertarle la realización de una biopsia puesto que el tumor se beneficiaría de un tratamiento precoz.

En cambio si el riesgo de desarrollar un tumor de alto riesgo es bajo en función de los datos obtenidos en los cocientes, podríamos evitar la biopsia inmediata y vigilar.

## **6.4 DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS ESTRATIFICADO DE LAS VARIABLES GENÉTICAS (POLIMORFISMO C/T rs 198977 Y ALELOS), Y PROTEÍNA HK2**

### *POLIMORFISMO C/T RS 198977 Y ALELOS*

Para analizar cómo se relacionaban el polimorfismo rs 198977 C/T y el resultado de la biopsia de próstata, se ha estudiado dicha asociación estratificando por las diferentes variables clínico-patológicas incluidas en el estudio. Se pretendía analizar cómo se comportaba esta relación en función de la presencia de unas y otras variables tanto clínicas como referidas a ecografía y a parámetros analíticos.

En el análisis estratificado de hK2/ PSA libre se observó una tendencia a la significación estadística entre el polimorfismo y el resultado de la biopsia en el cuartil hK2/PSA libre 3,66-7,75 ( $p=0,055$ ) En ese subgrupo de porcentaje de los pacientes con genotipo TT el 57 % (N 8) tenían biopsia positiva y ningún paciente ASAP/PINAG.

Cuando analizamos la relación entre el polimorfismo rs 198977 C/T y el resultado de la biopsia estratificando en función de los cuartiles de hK2x PSA total/PSA libre se observó una tendencia a la significación ( $p=0,066$ ) en el subgrupo de pacientes con hK2 x PSA total/PSA libre < de 0,16. No encontramos resultados similares en la literatura estudiada.

Cuando se estratifica en función de la concentración sérica de hK2, cuando es menor de 0,03 se obtiene una asociación estadísticamente significativa ( $p=0,015$ ) Este dato puede deberse a que en los pacientes con genotipo TT el 50% tenían biopsia positiva. El insuficiente número de pacientes TT (N=16) impide establecer conclusiones en este sentido pero si hacer hincapié en él ya que reproduce lo publicado al respecto del alelo T y los niveles bajos de hK2 en relación con el cáncer de próstata.

Algunos estudios han publicado la relación existente entre el polimorfismo rs 198977 del gen KLK2 y el riesgo aumentado de cáncer de próstata, añadiendo los niveles de hK2 como factor independiente.

Los primeros trabajos publicados al respecto fueron los de Nam et al en el año 2003<sup>178</sup> y 2006<sup>177</sup> donde hablaba de una correlación entre el polimorfismo C/T del gen KLK2 y los niveles en suero de la proteína hK2 para ayudar en la selección de pacientes para realizar biopsia de próstata y distinguir que pacientes eran candidatos a realizar una segunda biopsia si la primera era negativa. Hablaban en su trabajo que la combinación de este polimorfismo y la proteína hK2 aumentaban el valor predictivo positivo añadiéndose a los factores de riesgo habituales ya establecidos para cáncer de próstata (edad, PSA y tacto rectal anómalo) Concluían que entre los pacientes con un valor predictivo positivo bajo basándose en los factores de riesgo habituales (edad < 70 años, PSA < de 10 ng/dl y ausencia de nódulo palpable en el tacto), el efecto del gen KLK2 y los niveles en el suero de hK2, doblaban el valor predictivo positivo.

Para varones con altos niveles de hK2 y al menos un alelo T en combinación la odds ratio que obtenían para cáncer de próstata era de 13,92 (95% CI,  $p < 0,001$ ).

En el año 2006 <sup>177</sup> continúan con los trabajos sobre el gen KLK2 y demuestran una vez más la asociación positiva con cáncer de próstata y su correlación con los niveles de hK2 en suero.

Ya en el año 2010 el grupo de Hans Lilja del Memorial en Nueva York demuestran una fuerte asociación entre el polimorfismo rs 198977 del gen KLK2 y los niveles en sangre de hK2 para predecir cáncer de próstata. Publicaban datos muy similares al grupo de trabajo de Toronto dirigido por Nam. Decían que entre los varones con niveles bajos de hK2 en suero, aquellos con el alelo T en el polimorfismo rs 198977 tenían mayor probabilidad de desarrollar cáncer de próstata, mientras que entre hombres con niveles proteicos de hK2 altos, aquellos con y sin alelo T tenían leves diferencias en la probabilidad de padecer cáncer de próstata <sup>185</sup>.

Los datos publicados por ambos grupos de trabajo parecen concordar con los obtenidos en este trabajo. En el presente estudio en los pacientes con niveles de hK2 en suero menores de 0,03 se demostró una asociación positiva entre el alelo T y el resultado de biopsia positiva para cáncer de próstata. La limitación fundamental de nuestro resultado es que a pesar de que se encuentra en la línea de lo publicado hasta ahora, tan solo tenemos en ese grupo 16 pacientes con genotipo TT.

Sería muy interesante poder ampliar la muestra y conseguir reproducir con más potencia los resultados publicados.

Sin embargo a pesar de que parecía que la relación entre el alelo T y el resultado de los niveles de hK2 estaba clara, el mismo grupo de Nam en un trabajo muy reciente del año 2014 arrojaba nuevos datos. Por un lado

confirmaban que añadir los niveles de hK2 junto al polimorfismo del gen KLK2 mejoraba la predicción de cáncer de próstata, y por otro concluían que el alelo T se relacionaba con cáncer de próstata pero esta vez con niveles altos de la proteína hK2 <sup>187</sup>. Además en la línea del diseño de este trabajo iniciado en el año 2012, desarrollaron un nomograma en el que añadían sobre el modelo basal la proteína y el gen, sin mejorar el área bajo la curva significativamente (de 0,67 del modelo basal a 0,69;  $p=0.6$ ).

Por lo tanto aunque la relación entre el polimorfismo C/T rs 198977, la proteína y la biopsia de próstata es positiva, es necesario incorporar nuevos biomarcadores que mejoren la predicción de cáncer y validar diferentes nomogramas en múltiples cohortes para poder extender su uso y que su utilidad sea demostrada. Igualmente es necesario que el estudio de nuevos biomarcadores se desarrolle en cohortes más amplias para intentar conseguir asociaciones significativas.

Este análisis estratificado se realizó por cada alelo por separado. Se ha estudiado la asociación entre el alelo C y el resultado de la biopsia de próstata, estratificado por las diferentes variables clínico-patológicas del estudio.

Con respecto al alelo C que es el más frecuente en nuestro estudio y en las poblaciones de todos los estudios analizados, no se obtuvieron relaciones claramente positivas al realizar la estratificación.

Según la presencia de una próstata indurada en el tacto rectal se observó una tendencia a la significación estadística ( $p=0,058$ ) entre el alelo C y el resultado de la biopsia. Dentro del grupo con induración, el 60% de los pacientes con presencia de alelo C tenían una biopsia positiva para cáncer de próstata. Este dato no aporta información adicional ya que un tacto indurado se asocia a cáncer de próstata siendo un dato aceptado en toda la literatura publicada.

Se estratificó también en función de si la próstata en el tacto rectal era adenomatosa o no lo era. La relación tendía a ser estadísticamente significativa ( $p=0,052$ ) en el grupo que no presentó tacto rectal adenomatoso. El 52,7% de los pacientes con alelo C en el grupo de próstata no adenomatosa tenían tumor en la biopsia frente al 31,3% con alelo C que no lo tenían. También fue un resultado acorde con los factores de riesgo reflejados en la literatura sobre diagnóstico de cáncer de próstata.

Al realizar la estratificación en función de los cuartiles de hK2/ PSA libre fue significativa estadísticamente en el grupo con cociente hK2/PSA libre entre 3,66- 7,75 ( $p=0,008$ ) En este cuartil el 56,7% de los pacientes con alelo C tenían un resultado negativo en la biopsia, y el 18,9% tenían ASAP/PINAG. Estos datos van a favor de la relación que existe en la literatura entre el alelo C y el menor riesgo de cáncer de próstata.

Igualmente se ha estudiado la asociación entre el alelo T y el resultado de la biopsia de próstata, estratificado por las diferentes variables clínico-patológicas del estudio.

Al estratificar en función del cociente hK2xPSA total/PSA libre la relación del alelo T y la biopsia fue significativa ( $p=0,019$ ) en el grupo de pacientes con el cociente hK2xPSA total/PSA libre  $<$  de 0,165. En este cuartil es significativamente más frecuente dentro del grupo con alelo T obtener un resultado negativo en la biopsia (67,9%), ASAP/PINAG 14,3% y biopsia positiva 17,9%. El cociente hK2xPSA total/PSA libre  $>$  de 0,59 en páginas anteriores de este trabajo hemos visto como se asociaba significativamente con el resultado de biopsia positiva, por lo que tendría sentido que niveles bajos se asociaran con biopsia negativa.

Se analizó la asociación entre el alelo T y el resultado de la biopsia estratificando por la concentración de la proteína hK2 en suero. En el grupo de pacientes con

proteína hK2 < de 0,03 fue significativo que de los 8 pacientes que tuvieron cáncer en la biopsia, el 37,5% tenían el alelo T frente al 62,5% que no lo tenían. Previamente al estudiar la asociación del genotipo en función de la proteína, cuando era menor de 0,03 se obtenía significación estadística ( $p=0,015$ ) debida a que de los pacientes con genotipo TT el 50% tenían biopsia positiva. Estos resultados posiblemente se deban al escaso número de pacientes con alelo T y biopsia positiva con esos niveles de proteína por debajo de 0,03. Aun así hay que tener en cuenta que en este estudio no se ha podido demostrar la asociación entre el alelo T y la biopsia positiva para cáncer de próstata.

### ***PROTEINA HK2***

Como se ha ido analizando con anterioridad, a continuación se expone la discusión de los resultados del estudio de la asociación entre la proteína hK2 y el resultado de la biopsia de próstata, estratificado por las diferentes variables clínico-patológicas incluidas en el estudio.

Se analiza la relación entre la concentración de la proteína hK2 y el resultado de la biopsia de próstata estratificada en función del volumen del tacto rectal. En los pacientes con próstatas con volumen II/IV se observó una relación significativa entre la proteína hK2 y la biopsia de próstata ( $p=0,031$ ) En los pacientes con TR II/IV, en el grupo de  $hk2 < 0,03$  el 50% tienen biopsia positiva, siendo escaso el número de pacientes de este grupo. También hay pocos pacientes en el grupo de TR grado III y grado IV.

Con respecto a la relación entre la proteína hK2 y la biopsia de próstata estratificada por el consumo abundante de grasas, se observó una relación estadísticamente significativa en el grupo de consumo abundante de grasas ( $p=0,007$ ) En este grupo dentro de los pacientes con  $hk2=0,03$  es más frecuente tener una biopsia negativa (66,2%)

Al estratificar en función del PSA libre, la relación entre la proteína hK2 y el resultado de biopsia fue estadísticamente significativa ( $p=0,034$ ) En el grupo de pacientes con PSA libre entre 1,12-1,74 los pacientes con una proteína  $<$  de 0,03 ninguno tenía una biopsia negativa. En el resto de los subgrupos de proteínas lo más frecuente era obtener una biopsia negativa. La limitación importante de este resultado es el escaso número de pacientes con proteína hK2  $<$  de 0,03 ng/dl.

Al analizar la relación de la proteína hK2 y el resultado de la biopsia en función del volumen prostático, se observó una relación que tendía a la significación estadística en el grupo de volumen prostático 56-74,6 cc ( $p= 0,052$ ) En este grupo los pacientes con la proteína hK2  $<$  de 0,03 era mayor el porcentaje de pacientes con biopsia positiva (75%) Este dato es contradictorio porque como se ha dicho antes las próstatas pequeñas son las asociadas con cáncer de próstata. Igualmente son los valores más altos de hK2 los que claramente se asocian en los trabajos publicados con cáncer de próstata.

Cuando se analizó la relación entre la proteína hK2 y el resultado de la biopsia en función del cociente libre/total  $<$  o  $>$  20 se observó una tendencia a la significación estadística en el grupo de cociente libre/total  $>$  de 20 ( $p=0,08$ ) En este grupo los pacientes con niveles de proteína  $<$  de 0,03 ninguno tenía biopsia positiva, siendo el 50% biopsia negativa y el 50% ASAP/PINAG. Estos datos se asocian con el hecho de que ratio libre /total  $>$  20 se asocia a biopsias negativas. En este caso ninguno tenía cáncer cuando era  $>$  de 20.

En conclusión, no se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre los niveles de proteína hK2 y el resultado de la biopsia en función de los factores de riesgo asociados. Esto puede ser debido al escaso tamaño muestral.

Con respecto a los datos publicados sobre la relación de la proteína hK2 con datos clínicos de pacientes (factores de riesgo de cáncer de próstata, variables

ecográficas), no se han desarrollado trabajos hasta el momento. Parece que solo se han tenido en cuenta la edad y el tacto rectal a la hora de incluir en un modelo predictivo junto a la calicreína hK2 y las formas moleculares del PSA de los cuales hablaremos más adelante.

## 6.5 MODELO PREDICTIVO

El tercero de los objetivos secundarios del trabajo fue crear un modelo matemático predictivo del resultado de la biopsia prostática transrectal, en pacientes con cribado positivo para cáncer de próstata, combinando 4 calicreínas: PSA libre, total, ligado y hK2, además de la edad y el tacto rectal. Con este modelo se pretendía disminuir el número de biopsias prostáticas innecesarias y las complicaciones asociadas a este procedimiento.

Para ello se llevó a cabo un análisis multivariable en el que analizamos diferentes variables relacionadas con el cáncer de próstata, la proteína hK2 y el polimorfismo 198977. El modelo basal que incluía edad, tacto rectal y PSA total obtuvo un AUC de 0,73 mientras que los modelos clínico (basal+volumen+ historia de cáncer) y los 3 experimentales (clínico+ hK2/PSA total; clínico+hK2 y clínico+hK2+polimorfismo) conseguían incrementar el AUC llegando a 0,83, y por lo tanto mejorar la capacidad de predicción de cáncer de próstata. Estos resultados son más elevados o similares a los obtenidos en la literatura, comparándolos con las AUC de los modelos desarrollados en los que se incluía la proteína hK2 (Tabla 6-8) Con respecto al modelo basal, el AUC que se obtiene en este trabajo es más elevado que lo publicado; posiblemente por las diferencias en el tipo de paciente que se incluye en cada estudio. Con respecto al AUC de 0,83 que obtenemos al combinar el modelo clínico más la proteína, es el más alto tras el 0,84 que describe Vickers en el 2008. Estos autores meten en el modelo el PSA libre y el intacto y nosotros no ya que el PSA libre no obtiene significación estadística en este trabajo y el intacto es muy lábil. En el resto de

los estudios se incluyen en el modelo completo junto a la proteína hk2, el PSA libre y el intacto; aun así el AUC que obtienen es menor al nuestro.

Igualmente se ha evidenciado en este trabajo que el uso de los modelos clínico y los que asocian la proteína hK2 y el polimorfismo 198977, reducen el número de biopsias de próstata innecesarias un 11,3% para diagnosticar el mismo número de tumores prostáticos.

Tabla 6-8. Comparación de las áreas bajo la curva (AUC) de los diferentes grupos de trabajo en función de los modelos predictivos de cáncer de próstata desarrollados.

GRUPOS DE TRABAJO	AUC (IC 95%); CÁNCER DE PRÓSTATA		
	BASAL (PSA total+edad)	CLINICO(PSA total+edad+TR)	CLINICO+hK2+ PSA libre e intacto
2008 Vickers, Goteborg	0,68	0,72	0,84
2010 Vickers, Rotterdam (1º)	0,63	0,69	0,70
2010 Vickers, France		0,63	0,78
2010 Vickers, Rotterdam (2º)	0,55	0,58	0,71
2010 Vickers, Gothenburg	0,56	0,62	0,69
2011 Vickers, Suecia	0,65		0,75
2014 Nam, Toronto	Edad, etnia, PSA total, TR, historia CP, volumen AUC: 0,67		Clinico+hk2+C/T rs 198977 AUC: 0,69
2015 Vickers, ProTECT Study	0,63		0,71
<b>2015 este trabajo</b>	<b>0,73</b>	<b>0,83</b>	<b>Clinico+hK2: 0,83</b> <b>Clinico+hK2/PSA total: 0,83</b> <b>Clínico+ hk2+ rs C/T 198977</b>

En el año 2008 el grupo de Vickers <sup>139</sup> desarrollo por primera vez un modelo multivariable que incluía cuatro caliceinas: el PSA total, el PSA libre, el PSA intacto y la proteína hK2. Lo que hicieron fue calcular el área bajo la curva (AUC) para predecir cáncer de próstata en la biopsia. Comparaban el AUC de un modelo clínico incluyendo la edad, el PSA total y el tacto rectal, con el AUC que se obtenía añadiendo a ese modelo el PSA libre e intacto y la proteína hK2. El

área bajo la curva mejoro de 0,72 a 0,84. Por lo tanto concluían que el modelo de las cuatro calicreinas sumado a los parámetros clínicos usados podía predecir mejor la presencia de cáncer de próstata. Este modelo se desarrolló sobre pacientes que se sometían por primera vez a screening de cáncer de próstata.

Posteriormente el mismo grupo en el año 2010 <sup>140</sup> replicó sus resultados sobre una cohorte de 2914 correspondiente a varones de Rotterdam del European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer. Eran pacientes que no habían sufrido screening previo, todos ellos con PSA  $\geq 3$  ng/dl. Demostraron con el panel de las cuatro calicreinas que podían disminuir el número de biopsias y que solo un pequeño número de tumores serían aconsejados en contra de realizar biopsia inmediata. Muchos de los cuales eran tumores de bajo estadio y riesgo. El AUC que obtenían para el modelo que combinaba tacto rectal, edad y cuatro calicreinas era de 0,78. Asimismo no aconsejaban su uso si el PSA era  $>$  de 10 porque postulaban que se biopsiaba directamente.

Ese mismo año se hizo una validación independiente en la cohorte de Francia del European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer <sup>145</sup>. En 629 pacientes se aplicó este panel de cuatro calicreinas y se comparó con el modelo clínico basado en el PSA total, edad y tacto rectal. Se obtuvo una reducción importante en las tasas de biopsia dejando un porcentaje muy bajo de tumores de próstata (la mayoría de bajo grado), con retraso en su biopsia.

Estos estudios se realizaron en pacientes sin screening de PSA previo, por lo que al poco tiempo este mismo grupo comenzó a publicar estudios que replicaban sus hallazgos en pacientes con screening previo realizado. Pacientes que tras un primer cribaje con PSA normal, sufren un aumento posterior y se aplica el modelo predictivo.

El primero de los estudios se realizó sobre 1501 pacientes pertenecientes a la 2 y 3 vuelta del European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer.,

Rotterdam <sup>142</sup>. Concluyeron que el modelo desarrollado previamente en varones con screening previo podía aplicarse ayudando a predecir el resultado de una primera biopsia. Igualmente los tumores que se dejaban de biopsiar eran la mayoría T1c.

El mismo grupo del Memorial analiza su modelo predictivo en 1241 pacientes pertenecientes a la cohorte de Gothenburg del European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer <sup>141</sup>. Eran varones que ya habían pasado dos screening y que solo les hizo biopsia por la última subida del PSA. Tenían la hipótesis de que los modelos estadísticos para predecir resultado de biopsia no podían ser los mismos en pacientes con screening previo a pacientes sin screening. Concluyeron que el panel de las cuatro calicreinas era capaz de predecir bien el resultado de la biopsia en pacientes con screening previo. Asimismo concluían que la capacidad predictiva del PSA solo estaba afectada dramáticamente por la historia del screening, y que usado en solitario era muy mal predictor, por lo que aconsejaban usar modelos predictivos.

En el año 2011 en Suecia se replicó este mismo modelo pero sobre una cohorte de 474 varones ya diagnosticados de cáncer de próstata (cohorte histórica) Concluían que en pacientes con  $PSA \geq 3$ , si según el modelo predictivo eran tumores de bajo riesgo, era muy improbable que desarrollaran tumores incurables. Igualmente comentaban como principal limitación que no podían usar el tacto rectal y la posibilidad de que según el ambiente y la etnia puedan variar los resultados <sup>146</sup>.

Aunque no son los mismos pacientes del presente estudio, este modelo de las cuatro calicreinas sumado a los parámetros clínicos (edad, tacto rectal, número de cilindros afectados, Gleason y estadio clínico) se evaluó en 392 pacientes con cáncer de próstata que se iban a someter a prostatectomía radical. Concluían que ayudaba a predecir cáncer avanzado o insignificante, y así evitar cirugías innecesaria <sup>147</sup>.

En el año 2011 el grupo de Lilja realizó un estudio sobre la variabilidad intraindividual en la medición de las calicreinas en cada varón. Concluyeron que esta variación dentro de cada paciente era muy pequeña por lo que el panel de 4 calicreinas era un test muy reproducible <sup>296</sup>.

Durante los meses del año 2015 el mismo grupo ha publicado 3 artículos sobre este panel de calicreinas. En uno de ellos replica su panel y lo valida en pacientes a los que tiene en cuenta PSA > 3 ng/dl, TR rectal anómalo e incluye el ratio PSA libre /total <20. Concluye los mismos resultados sobre el ahorro de biopsias de próstata <sup>297</sup>. Igualmente validan sus resultados sobre 4765 muestras de plasma criopreservado de varones pertenecientes a un ensayo clínico (Protect Study) todos ellos con PSA >3 <sup>298</sup>. Por último replican su panel sobre 1986 pacientes de Suecia, todos con cáncer de próstata. Contrastan su panel sobre sangre preservada de estos pacientes con el objetivo de mejorar la especificidad para la detección de cáncer de próstata letal concluyendo que los varones de 50 a 60 años con PSA en el cuartil más elevado se beneficiarían de la realización de un panel de calicreinas para tomar la decisión de biopsiar <sup>299</sup>.

En nuestro trabajo además hubiéramos querido poder demostrar la asociación entre el polimorfismo rs 198977 del gen *KLK2* y la proteína hK2 para predecir cáncer y desarrollar un Nomograma usando parámetros clínicos ya estandarizados como el tacto rectal, edad, historia familiar de cáncer, síntomas del tracto urinario y añadir las cuatro calicreinas y además el polimorfismo genético. En un estudio del que ya se ha hablado en este trabajo del grupo de Nam del 2014 desarrollaron un Nomograma con todos estos parámetros pero concluyeron que el AUC que se obtenían al añadir el polimorfismo y la proteína hK2 al modelo basal no aumentaba la predicción de cáncer de próstata (AUC aumento del 0,67 del modelo basal a 0,69; p 0,6) Estos datos son similares a los obtenidos en este estudio, donde añadir la proteína y el polimorfismo en un modelo predictivo no mejora el AUC del modelo que combina variables clínicas.



## **7 CONCLUSIONES**

---



1. La concentración en suero de la proteína hK2 es más elevada en los varones con cáncer de próstata.
2. En pacientes sometidos a prostatectomía radical, a mayor concentración de hK2, mayor probabilidad de que existan márgenes positivos.
3. El cociente hK2xPSA total/libre se relaciona significativamente con el cáncer de próstata. El cociente hK2/PSA total se relaciona con tumores de próstata de peor pronóstico.
4. En el presente trabajo no se ha podido demostrar la relación entre el polimorfismo C/T rs 198977 del gen KLK2 con el riesgo de padecer cáncer de próstata ni con la proteína hK2 y las formas moleculares del PSA.
5. Los pacientes con genotipo TT tienen niveles séricos de hK2 bajos, obteniendo un valor medio de 0,05 ng/dl.
6. El genotipo TT se relaciona significativamente con un resultado positivo en la biopsia cuando la concentración sérica de hK2 es menor de 0,03 ng/dl.
7. La aplicación de un modelo matemático predictivo que combine variables clínicas consigue aumentar el área bajo la curva hasta 0,83. Añadir al modelo clínico parámetros como la proteína hK2, hK2/PSA total o polimorfismo rs 198977 no aumenta la capacidad predictiva de cáncer prostático.
8. El uso de modelos predictivos clínicos podrían reducir el número de biopsias prostáticas innecesarias.



## 8 BIBLIOGRAFÍA

---



1. Arnold M, Karim-Kos HE, Coebergh JW, Byrnes G, Antilla A, Ferlay J et al. Recent trends in incidence of five common cancers in 26 European countries since 1988: Analysis of the European Cancer Observatory. *Eur J Cancer*. 2013 Oct. 8. Pii; S0959-8049:00842-3.
2. Ferlay J, Parkin DM Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe 2008. *Eur J Cancer* 2010; 46: 765-781
3. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
4. World Health Organization. International Agency for Research on cancer. Globocan 2012.
5. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)2014
6. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 8-31.
7. Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, et al. European Association of Urology. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *Eur Urol*. 2011a, 59:61-71.
8. Heidenreich A, Pfister D, Thüer D, Brehmer B. Percentage of positive biopsies predicts lymph node involvement in men with low-risk prostate cancer undergoing radical prostatectomy and extended pelvic lymphadenectomy. *BJU Int*. 2011b, 107:220-225.
9. J.M. Cózara, B. Miñanab, F. Gómez-Veiga, A. Rodríguez-Antolín, H. Villavicencio, A. Cantalapiedra y E. Pedrosa. Registro nacional de cáncer de próstata 2010 en España. *Actas Urol Esp*. 2013;37:12-19
10. Potosky AL, Miller BA, Albertsen PC, Kramer BS. The role of increasing detection in the rising incidence of prostate cancer. *JAMA*. 1995, 273: 548-552.
11. Brandt A, Bermejo JL, Sundquist J, Hemminki K. Age-specific risk of incident prostate cancer and risk of death from prostate cancer defined by the number of affected family members. *Eur Urol* 2010, 58: 275-280.
12. Jansson KF, Akre O, Garmo H, Adolfsson J, Stattin P, Bratt O. Concordance of tumor differentiation among brothers with prostate cancer. *Eur Urol* 2012 Oct; 62:656-61.

13. Hemminki K. Familial risk and familial survival in prostate cancer. *World J Urol* 2012 Apr; 30:143-8.
14. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992, 89: 3367-3371.
15. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, Walsh PC. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol*. 1993, 150: 797-802
16. Leitzmann MF, Rohrmann S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin Epidemiol* 2012;4:1-11.
17. Sánchez-Chapado M, Olmedilla G, Cabeza M, Donat E, Ruiz A. Prevalence of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia in Caucasian Mediterranean males: an autopsy study. *Prostate*. 2003, 15; 54:238-247.
18. Pienta KJ, Esper PS. Risk factors for prostate cancer. *Ann Intern Med*. 1993, 118: 793-803.
19. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med* 2003 Jul; 349:366-81.
20. Leitzmann MF, Rohrmann S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin Epidemiol* 2012; 4:1-11.
21. Ross RK, Bernstein L, Lobo RA, Shimizu H, Stanczyk FZ, Pike MC, Henderson BE. 5- $\alpha$ -reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *Lancet* 1992,339: 887-889.
22. Pienta KJ, Demers R, Hoff M, Kau TY, Montie JE, Severson RK. Effect of age and race on the survival of men with prostate cancer in the Metropolitan Detroit tricountry area, 1973 to 1987. *Urology* 1995, 45: 93-101.
23. Klotz L. Active surveillance for favourable risk prostate cancer: rationale, risks, and results. *Urol Oncol* 2007, 25: 505-509
24. Richman EL, Kenfield SA, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Chan JM. Egg, red meat, and poultry intake and risk of lethal prostate cancer in the prostate-specific antigen-era: incidence and survival. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011 Dec; 4:2110-21.
25. Price AJ, Allen NE, Appleby PN, Crowe FL, Travis RC, Tipper SJ et al. Insulin –

- like growth factor-I concentration and risk of prostate cancer: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012 Sep; 21: 1531-41.
26. Romero Cagigal I, Ferruelo Alonso A, Berenguer Sanchez A. Dieta y Cáncer de próstata. *Actas Urol Esp.* 2003, 27: 399-409.
  27. Peehl DM, Krishnan AV, Feldman. Pathways mediating the growth-inhibitory actions of vitamin D in prostate cancer. *J Nutr.* 2003 Jul; 133(7 suppl):2461S-2469S.
  28. Krishnan AV, Peehl DM, Feldman. The role of vitamin D in prostate cancer. *Recent results cancer Res.* 2003; 164:205-21. Review.
  29. Rodriguez M, Ferrer E, Ferrer C. Tratamiento multidisciplinario actual del cáncer de próstata metastásico. *Actas Urol Esp.* 2003; 27:767-82.
  30. Giovannucci E, Liu Y, Stampfer M, Willett W. A prospective study of calcium intake and incident and fatal prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15:203-10.
  31. Thompson IM, Klein EA, Lippman SM, Coltman CA, Djavan B. Prevention of prostate cancer with finasteride: US/European perspective. *Eur urol* 2003 Dec; 44:650-5. Review.
  32. Klein EA, Tangen CM, Goodman PJ, Lippman SM, Thompson IM. Assessing benefit and risk in the prevention of prostate cancer: the prostate cancer prevention trial revisited. *J Clin Oncol.* 2005 Oct 20;23:7460-6. Epub 2005 Sep 12.
  33. G.L. Andriole, D.G. Bostwick, O.W. Brawley, Gomella LG, Marberger M, Montorsi F et al., REDUCE Study Group. Effect of dutasteride on the risk of prostate cancer. *N Eng J Med.* 2010;362:1192-1202
  34. Morley JE. Testosterone replacement and the physiologic aspects of ageing in men. *Mayo Clin Proc.* 2000; 75: S83-7
  35. Uribe J. Cáncer de Próstata ¿Por qué se produce el cáncer de próstata? Aproximación a un modelo genético y molecular. *Revista Urológica Colombiana* 2005, 14: 1-14.
  36. Steers WD. 5 Alfa reductase activity in the prostate. *Urology*, vol 58, issue 6, suplement 1. 2001.

37. Andriole G, Bruchofsky N, Chung LW, Matsumoto AM, Rittmaster R, Roehrborn C, et al. Dihydrotestosterone and the prostate: the scientific rationale for 5 $\alpha$ -reductase inhibitors in the treatment of benign hiperplasia. *J Urol*. 2004 Oct; 172:1399-403.
38. Wilson JD, Roehrborn C. Long term consequences of castration in men: lessons from the Skoptzy and the eunuchs of the chinese and ottoman courts. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:4324-4331
39. Roehrborn C, Mc Connell J. Etiology, epidemiology and natural history of benign prostatic hiperplasia. In: Walsh P, Retik A, Vaughan E, Wein A. *Campbell's Urology* 8th edn. Saunders: Philadelphia, 2002, pp 1297-1336.
40. Calvo-Manuel FA y Pérez-Manga G. *Cáncer de Próstata. Documentos de Consenso Oncología*. 2002. Editorial Nova Sidonia. Madrid.
41. Shirakawa T, Okada H, Acharya B, Zhang Z, Hinata N. Messenger RNA levels and enzyme activities of alpha-reductase types 1 and 2 in human benign prostatic hiperplasia tissue. *Prostate* 2004; 58:33-40.
42. Bonkhoff H, Stein U, Aumuller G, Remberger K. Differential expression of 5 alphareductase isoenzymes in the human prostate and prostatic carcinomas. *Prostate* 1996; 29:261-7.
43. Cunha GR. Growth factors as mediators of androgen action during male urogenital developement. *Prostate Supl* 1996; 22-5.
44. Carballido J. *Nuevas tendencias en las opciones terapéuticas y selección de tratamiento en pacientes con cáncer de próstata*. 2011. Ed ENE ediciones. ISBN: 978-84-85395-96-5
45. Olivier C. Relevancia de la deprivacion androgénica en los tratamientos emergentes de la enfermedad hormon-refractaria: protagonismo del receptor androgénico. En: *más alla del bloqueo androgénico*. Ed Luzan. 2009; pag: 99-116. ISBN: 978-84-7989-565-5.
46. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle kinases in cáncer *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17, 60-5.
47. Shapiro GL. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cáncer treatment. *J Clin Oncol* 2006; 24, 1770-83.
48. Xu Y, Chen SY, Ross KN, Balk SP. Androgens induce prostate cáncer cell proliferation through mammalian target of rapamycin activation and post-

- transcriptional increases in cyclin D proteins. *Cancer Res* 2006; 66: 7783-92.
49. Knudsen KE, Arden KC, Cavenee WK. Multiple G1 regulatory elements control the androgen dependent proliferation of prostatic carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 20213-22.
  50. Gao H, Ouyang X, Banach-Petrosky W, Borowsky A, Lin Y, Kim M. Critical role for p27kip1 gene dosage in a mouse model of prostate carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Dec 7; 101: 17204-9.
  51. Jarrad DF, Modder J, Fadden P, Fu V. Alterations in the p16/pRb cell cycle checkpoint occur commonly in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Lett* 2002; 185:191-9.
  52. Jenster G, de Ruiter PE, van der Korput HA, Kuiper GG, Trapman J, Brinkmann AO. Changes in the abundance of androgen receptor isoforms. Effects of ligand treatment, glutamine stretch variation, and mutation of putative phosphorylation sites. *Biochem. J* 1994, 33: 14064-14072
  53. Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, et al. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997, 94: 3320-3323.
  54. Hardy DO, Scher HI, Bogenreider T, Sabbatini P, Zhang ZF, Nanus DM, Catterall JF. Androgen receptor CAG repeat lengths in prostate cancer: Correlation with age of onset. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996, 81: 4400-4405.
  55. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*. 1992, 12: 241-253
  56. Suzuki H, Sato N, Watabe Y, Masai M, Seino S, Shimazaki J. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1993, 46: 759-765.
  57. Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, et al. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med*. 1995, 332: 1393-1398.
  58. Evans BA, Harper ME, Daniells CE, Watts CE, Matenhelia S, Green J, Griffiths K. Low incidence of androgen receptor gene mutation polymorphism analysis. *Prostate* 1996, 28: 162-171.

59. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinanen R, Palmberg C, et al. In vitro amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet.* 1995, 9: 401-406
60. Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Tammela T, Hyytinen E, Isola J, et al. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res.* 1997, 57: 314-319.
61. Elo JP, Kvist L, Leinonen K, Isomaa V, Henttu P, Lukkarinen O, Vihko P. Mutated human androgen receptor gene detected in a prostatic cancer patient is also activated by estradiol. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995, 80: 3494-3500.
62. Bentel JM, Buchanan G, Tilley WD. Androgen receptor gene mutations in prostate cancer. En: Naz RD (ed.): *Prostate: Basic and clinical aspects.* Boca Raton, Fl: CRC, 1997, 220-244.
63. Fenton MA, Shuster TD, Fertig AM, Taplin ME, Kolvenbag G, Bubley GJ, Balk SP. Functional characterization of mutant androgen receptors from androgen-independent prostate cancer: *Clin Cancer Res.* 1997, 3: 1383-1388.
64. Zheng SL. Cumulative association of five genetic variants with prostate cancer. *N Engl J Med,* 2008. 358: p.910-9.
65. Hanahan D. The hallmarks of cancer. *Cell,* 2000; 100:57-10.
66. Pomerantz M.M. Genetics determinants of prostate cancer risk. *BJU Int,* 2007; 100:241-3.
67. Amundadottir LT, Sulem P, Gudmundsson J, Helgason A, Baker A, Agnarsson BA et al. A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nat Genet,* 2006; 38:652-8.
68. Rosalind A Eeles, Zsofia Kote-Jarai, Graham G Giles, Ali Amin Al Olama, Michelle Guy. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* 2008; 40:316-21.
69. Thomas G, Jacobs KB, Yeager M, Kraft P, Wacholder S, Orr N et al. Multiple loci identified in a genome wide association study of prostate cancer. *Nat Genet,* 2008; 40:316-21.
70. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW et

- al. Recurrent fusión of TMPRSS2 and ETS transcription genes in prostate cáncer. *Science*, 2005; 310: 644-8.
71. Nam RK Sugar L, Yang W, Srivastava S, Klotz LH, Yang LY et al. Expression of the TMPRSS2: ERG fusión gen predicts cáncer recurrence after surgery for localised prostate cáncer. *BR J Cancer*, 2007; 97:1690-5.
  72. Attard G Clark J, Ambrosine L, Fisher G, Kovacs G, Flohr P, et al. Duplication of the fusión of TMPRSS2 to ERG secuencias identified fatal human prostate cáncer. *Oncogene*, 2008, 27:253-63.
  73. Mehra R Tomlins SA, Shen R, Nadeem O, Wang L, Wei JT et al. Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS familiy gene aberrations in clinical localised prostate cáncer. *Mod Pathol*, 2007; 20:538-44.
  74. Varambally S Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cáncer. *Nat* 2002; 419:624-9.
  75. Rubin MA Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG et al. Alpha-metilacyl-coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cáncer. *JAMA*, 2002; 287: 1662-67.
  76. Rubin MA Bismar TA, Andrén O, Mucci L, Kim R, Shen R, et al. Decreased Alpha-metilacyl-coenzyme A racemase expression in localised prostate cáncer is associated with an increased rate of biochemical recurrence and cáncer specific death. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005; 14:1424-32.
  77. Lapointe J Li C, Higgins JP, van de Rijn M, Bair E, Montgomery K et al. Gene expression prolifing identified clinically relevant subtypes of prostate cáncer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101:811-6.
  78. Bastian PJ Ellinger J, Heukamp LC, Kahl P, Müller SC, von Rücker A. et al. Prognostic value of CpG island hypermethylation at PTGS", RAR beta, and other gene loci in patients undergoing radical prostatectomy. *Eur Urol*, 2007; 51: 665-74.
  79. Shahrokh F. Sharia, Axel Semjonow, Hans Lilja, Caroline Savage, Andrew J. Vickers. Tumor markers in prostate cancer I: Blood-based markers. *Acta oncológica*, 2011; 50: 61-7
  80. SEER Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. 2006.

81. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL 3rd. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* 2009 Mar; 360:1310-9.
82. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V et al. ERSPC Investigators. Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. *N Engl J Med* 2012 Mar; 366:981-90.
83. .Hugosson J, Carlsson S, Aus G, Bergdahl S, Khatami A, Lodding P, et al. Mortality results from the Göteborg randomised populationbased prostate-cancer screening trial. *Lancet Oncol* 2010 Aug; 11:72 32.
84. Carvalhal GF, Smith DS, Mager DE, Ramos C, Catalona WJ. Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng/mL or less. *J Urol* 1999 Mar; 161:835-9.
85. Okotie OT, Roehl KA, Han M, Loeb S, Gashti SN, Catalona WJ. Characteristics of prostate cancer detected by digital rectal examination only. *Urology* 2007 Dec; 70:1117-20.
86. Gosselaar C, Roobol MJ, Roemeling S, Schröder FH. The role of the digital rectal examination in subsequent screening visits in the European randomized study of screening for prostate cancer (ERSPC), Rotterdam. *Eur Urol* 2008 Sep; 54(3):581-8.
87. Hara M, Koyanagi Y, Inoue T, Fukuyama T. Some physicochemical characteristics of “-seminoprotein”, an antigenic component specific for human seminal plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion. VII. *Nippon Hoigaku Zasshi*. 1971; 25:322-324.
88. Seregni E, Botti C, Ballabio G, Bombardieri E. Biochemical characteristics and recent biological knowledge on prostatespecific antigen. *Tumori*. 1996; 82:72-77.
89. Wang MC, Papsidero LD, Kuriyama M, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Prostate antigen: a new potential marker for prostatic cancer. *Prostate*. 1981; 2:89-96.
90. Oesterling JE. Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* 1991; 145:907-23.
91. Graves HC. Nonprostatic sources of prostate-specific antigen: a steroid hormone-dependent phenomenon? *Clin Chem*. 1995; 41:7-9.

92. Lilja H. A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest.* 1985; 76:1899-1903.
93. Fortier AH, Nelson BJ, Grella DK, Holaday JW. Antiangiogenic activity of prostate-specific antigen. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91:1635-1640.
94. Lilja H, Christensson A, Dahlen U, Matikainen MT, Nilsson O, Pettersson K, et al. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clin Chem.* 1991; 37:1618-1625.
95. Vessella RL, Lange PH. Issues in the assessment of prostatespecific antigen immunoassays. An update. *Urol Clin North Am.* 1997; 24:261-268.
96. Shahrokh F. S, Axel S, Hans Lilja, Caroline Savage, Andrew J. Vickers, Anders Bjartell. Tumor markers in prostate cancer I: Blood-based markers. *Acta Oncologica*, 2011; 50: 61–75
97. Uzzo RG, Wei JT, Waldbaum RS, Perlmutter AP, Byrne JC, Vaughan ED. The influence of prostate size on cancer detection. *Urology.* 1995; 46:831-6.
98. Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL, Wang TJ, Rittenhouse HG, Ratliff TL, et al. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. *JAMA.* 1995; 274:1214-20.
99. Taneja, Samir S Tran K, Lepor H. Volume-specific cutoffs are necessary for reproducible application of prostate-specific antigen density of the transition zone in prostate cancer detection. *Urology*, Volume 58, Issue 2, 222 – 226
100. Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, Brant LJ, Chan DW, Andres R, et al. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *Jama.* 1992; 267:2215-20.
101. Llorente C, de la Morena J, Álvarez Ardura M. PSA doubling time as a new diagnostic and prognostic method for prostate cáncer. *Arch. Esp. Urol. dic.* 2006 v.59 n.10 Madrid
102. Woodrum DL, Brawer MK, Partin AW, Catalona WJ, Southwick PC. Interpretation of free prostate specific antigen clinical research studies for the detection of prostate cancer. *J Urol.* 1998; 159:5-12.
103. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, Brawer MK, Flanigan RC, Patel A et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance

differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicentre clinical trial. *JAMA* 1998 May; 279:1542-7.

104. Stephan C, Lein M, Jung K, Schnorr D, Loening SA. The influence of prostate volume on the ratio of free to total prostate specific antigen in serum of patients with prostate carcinoma and benign prostate hyperplasia. *Cancer* 1997 Jan; 79:104-9.
105. Woodrum DL, Brawer MK, Partin AW, Catalona WJ, Southwick PC. Interpretation of free prostate specific antigen clinical research studies for the detection of prostate cancer. *J Urol* 1998; 159:5 – 12.
106. Mikolajczyk SD, Marks LS, Partin AW, Rittenhouse HG. Free prostate-specific antigen in serum is becoming more complex. *Urology* 2002; 59:797 – 802.
107. Loeb S, Sanda M, Dennis L, Shin S, Bangma C, Wei J et al. The prostate Health Index selectively identifies clinically significant prostate cancer. *J Urol*. 2015 April, 193:1163-1169.
108. Canto EI, Singh H, Shariat SF, Lamb DJ, Mikolajczyk SD, Linton HJ, et al. Serum BPSA outperforms both total PSA and free PSA as a predictor of prostatic enlargement in men without prostate cancer. *Urology* 2004; 63:905 – 10.
109. Alapont Alacreu JM, Navarro Rosales S, Budía Alba A, España Furió F\*, Morera Martínez F, Jiménez Cruz JF. PSA y hK2 en el diagnóstico de cáncer de próstata. *Actas Urol Esp*. 2008;32:575-588
110. Steuber T1, Nurmikko P, Haese A, Pettersson K, Graefen M, Hammerer P, Huland H, Lilja H. Discrimination of benign from malignant prostatic disease by selective measurements of single chain, intact free prostate specific antigen. *J Urol*. 2002 Nov;168:1917-22
111. Okihara K, Ukimura O, Nakamura T, Mizutani Y, Kawauchi A, Naya Y, et al. Can complexed prostate specific antigen enhance prostate cancer detection in Japanese men? *Eur Urol*. 2004; 46:57-64.
112. Kobayashi T, Kamoto T, Nishizawa K, Mitsumori K, Ogura K, Ide Y. Prostate-specific antigen (PSA) complexed to alpha1-antichymotrypsin improves prostate cancer detection using total PSA in Japanese patients with total PSA levels of 2.0-4.0 ng/mL. *BJU Int*. 2005; 95:761-765.
113. Okegawa T, Noda H, Nutahara K, Higashihara E. Comparisons of the

various combinations of free, complexed, and total prostate-specific antigen for the detection of prostate cancer. *Eur Urol.* 2000; 38:380-387.

114. Saika T, Tsushima T, Nasu Y, Kusaka N, Miyaji Y, Takamoto H, et al. Prostate specific antigen complexed to alpha-1-antichymotrypsin in patients with intermediate prostate specific antigen levels. *Cancer.* 2002; 94:1685-1691.
115. Parsons JK, Brawer MK, Cheli CD, Partin AW, Djavan R. Complexed prostate specific antigen (PSA) reduces unnecessary prostate biopsies in the 2.6-4.0 ng/mL range of total PSA. *BJU Int.* 2004; 94:47-50.
116. Lein M, Kwiatkowski M, Semjonow A, Luboldt HJ, Hammerer P, Stephan C, et al. A multicenter clinical trial on the use of complexed prostate specific antigen in low prostate specific antigen concentrations. *J Urol.* 2003; 170:1175-1179.
117. Jung K, Stephan C, Elgeti U, Lein M, Brux B, Kristiansen G, et al. Molecular forms of prostate-specific antigen in serum with concentrations of total prostate-specific antigen <4 microg/L: are they useful tools for early detection and screening of prostate cancer? *Int J Cancer.* 2001; 93:759-765.
118. Okihara K, Fritsche HA, Ayala A, Johnston DA, Allard WJ, Babaian RJ. Can complexed prostate specific antigen and prostatic volume enhance prostate cancer detection in men with total prostate specific antigen between 2.5 and 4.0 ng/ml. *J Urol.* 2001; 165:1930-1936.
119. Bensalah K, Montorsi F, Shariat SF. Challenges of cancer biomarker profiling. *Eur Urol* 2007; 52:1601 – 9.
120. Borgon CA, Diamandis EP (2004) The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer* 4: 876–890.
121. Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ (2008) Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer* 8: 268–278.
122. Pavlopoulou A, Pampalakis G, Michalopoulos I, Sotiropoulou G (2010) Evolutionary History of Tissue Kallikreins. *PLoS ONE* 5:e13781. doi:10.1371/journal.pone.0013781
123. Girish Sardana, Barry Dowell, Eleftherios P. Diamandis. Emerging Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Prostate Cancer. *Clinical Chemistry* 2008;54:12 1951–1960

124. Deperthes D, Chapdelaine P, Tremblay RR, Brunet C, Berton J, Hebert J, et al. Isolation of prostatic kallikrein hK2, also known as hGK-1, in human seminal plasma. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1245:311-316.
125. Finlay JA, Evans CL, Day JR, Payne JK, Mikolajczyk SD, Millar LS, et al. Development of monoclonal antibodies specific for human glandular kallikrein (hK2): development of a dual antibody immunoassay for hK2 with negligible prostate-specific antigen cross-reactivity. *Urology*. 1998; 51:804-809.
126. Wang TJ, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Lynne CM, Brackett NL. PSA concentrations in seminal plasma. *Clin Chem*. 1998; 44: 895-896.
127. Murtha P, Tindall DJ, Young CY. Androgen induction of a human prostate-specific kallikrein, hK2: characterization of an androgen response element in the 5' promoter region of the gene. *Biochemistry*. 1993; 32:6459-6464.
128. Partin AW, Catalona WJ, Finlay JA, Darte C, Tindall DJ, Young CY, et al. Use of human glandular kallikrein 2 for the detection of prostate cancer: preliminary analysis. *Urology*. 1999; 54: 839-845.
129. Rittenhouse HG, Finlay JA, Mikolajczyk SD, Partin AW. Human kallikrein 2 (hK2) and prostate-specific antigen (PSA): two closely related, but distinct, kallikreins in the prostate. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1998; 35:275–368.
130. Becker C, Piironen T, Pettersson K, Bjork T, Wojno KJ, Oesterling JE, et al. Discrimination of men with prostate cancer from those with benign disease by measurements of human glandular kallikrein 2 (HK2) in serum. *J Urol*. 2000; 163:311- 316.
131. Becker C, Piironen T, Pettersson K, Hugosson J, Lilja H. Clinical value of human glandular kallikrein 2 and free and total prostate-specific antigen in serum from a population of men with prostate-specific antigen levels 3.0 ng/mL or greater. *Urology*. 2000; 55:694-699.
132. Nam RK, Diamandis EP, Toi A, Trachtenberg J, Magklara A, Scorilas A, et al. Serum human glandular kallikrein-2 protease levels predict the presence of prostate cancer among men with elevated prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*. 2000; 18: 1036- 1042.
133. Vaisanen V, Eriksson S, Ivaska KK, Lilja H, Nurmi M, Pettersson K. Development of sensitive immunoassays for free and total human glandular kallikrein 2. *Clin Chem* 2004; 50:1607–17.

134. Steuber T, Vickers AJ, Serio AM, Vaisanen V, Haese A, Pettersson K, James A. Eastham, Scardino, PT, Huland H, and Lilja H. Comparison of Free and Total Forms of Serum Human Kallikrein 2 and Prostate-Specific Antigen for Prediction of Locally Advanced and Recurrent Prostate Cancer. *Clinical Chemistry* 2007;53:2 233–240
135. Steuber T, Vickers AJ, Serio AM, Vaisanen V, Haese A, Pettersson K, James A. Eastham, Scardino, PT, Huland H, and Lilja H. Risk assessment for biochemical recurrence prior to radical prostatectomy: significant enhancement contributed by human glandular Kallikrein 2 (hK2) and free prostate specific antigen (PSA) in men with moderate PSA-elevation in serum. *Int J Cancer*.2006 Mar 1; 118:1234-40.
136. Sven Wenske, Ruslan Korets, Angel M. Cronin, Andrew J. Vickers, Martin Fleisher, Howard I. Scher, Kim Pettersson, Bertrand Guillonneau, Peter T. Scardino, James A. Eastham, and Hans Lilja. Evaluation of molecular forms of PSA and human kallikrein 2 in predicting biochemical failure following radical prostatectomy. *Int J Cancer*. 2009 February 1; 124: 659–663.
137. Steuber T, Niemela P, Haese A, Pettersson K, Erbersdobler A, Felix Chun KH, Graefen M, Kattan MW, Huland H, Lilja H. Association of free-prostate specific antigen subfractions and human Wenske et al. Page 7 *Int J Cancer*. Author manuscript; available in PMC 2009 November 12. glandular kallikrein 2 with volume of benign and malignant prostatic tissue. *Prostate* 2005; 63: 13–8.
138. Shariat SF, Karam JA, Margulis V, Karakiewicz PI. New bloodbased biomarkers for the diagnosis, staging and prognosis of prostate cancer. *BJU Int* 2008; 101: 675 – 83.
139. Vickers AJ, Cronin AM, Aus G, Pihl CG, Becker C, Pettersson K, et al. A panel of kallikrein markers can reduce unnecessary biopsy for prostate cancer: Data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Goteborg, Sweden. *BMC Med* 2008; 6:19.
140. Vickers A, Cronin A, Roobol M, Savage C, Peltola M, Pettersson K, et al. Reducing unnecessary biopsy during prostate cancer screening using a four-kallikrein panel: An independent replication. *J Clin Oncol* 2010; 28:2493 – 8.
141. Vickers AJ, Cronin AM, Aus G, Pihl CG, Becker C, Pettersson K, et al. Impact of recent screening on predicting the outcome of prostate cancer biopsy in men with elevated prostate-specific antigen: Data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Gothenburg, Sweden.

Cancer 2010; 116: 2612 – 20.

142. Vickers AJ, Cronin AM, Roobol MJ, Savage CJ, Peltola M, Pettersson K, et al. A four-kallikrein panel predicts prostate cancer in men with recent screening: data from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer, Rotterdam. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3232 – 9.
143. Gupta A, Roobol MJ, Savage CJ, Peltola M, Pettersson K, Scardino PT, et al. A four-kallikrein panel for the prediction of repeat prostate biopsy: Data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Rotterdam, Netherlands. *Br J Cancer Epub* 2010 Jul 27.
144. Vickers AJ, Cronin AM, Aus G, Pihl C, Becker C, Pettersson K, Scardino PT, Hugosson J and Lilja H. Impact of recent screening on predicting the outcome of prostate cancer biopsy in men with elevated PSA: Data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Gothenburg, Sweden. *Cancer*. 2010 June 1; 116: 26-2620.
145. Benchikh A, Savage C, Cronin A, Salama G, Villers AJ, Lilja H, Vickers A. A panel of kallikrein markers can predict outcome of prostate biopsy following clinical work-up: an independent validation study from the European Randomized Study of Prostate Cancer screening, France. *BMC Cancer* 2010, 10:635
146. Vickers A, Gupta A, Savage C, Pettersson K, Dahlin A, Bjartell A, et al. A panel of kallikrein marker predicts prostate cancer in a large, population-based cohort followed for 15 years without screening. *Cancer epidemiology Biomarkers Prev*. 2011 March; 20:255-261.
147. Carlsson S, Maschino A, Schröder F, Bangma C, Steyerberg EW, van der Kwast T, et al. Predictive value of four kallikrein markers for pathologically insignificant compared with aggressive prostate cancer in radical prostatectomy specimens: results from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer section Rotterdam. *Eur Urol*. 2013 Nov; 64:693-9.
148. [www.opko.es](http://www.opko.es)\_“OPKO 4Kscore Test Package Insert rev 002”
149. Sotiropoulou G, Pampalakis G, Diamandis EP (2009) Functional roles of human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem* 284: 32989–32994.
150. Pavlopoulou A, Pampalakis G, Michalopoulos I, Sotiropoulou G (2010) Evolutionary History of Tissue Kallikreins. *PLoS ONE* 5: e13781. doi:10.1371/journal.pone.0013781

151. Halvorsen OJ, Høstmark J, Haukaas S, Høisaeter PA, Akslen LA.. Prognostic significance of p16 and CDK4 proteins in localized prostate carcinoma. *Cancer*, 2000; 88:416-24.
152. Rigaud J, Tiguert R, Decobert M, Hovington H, Latulippe E, Laverdiere J, Expression of p21 cell cycle protein is an independent predictor of response to salvage radioterapy after radical prostatectomy. *Prostate*, 2004; 58:269-76.
153. Oxley JD, Winkler MH, Parry K, Brewster S, Abbott C, Gillatt DA. P53 and bcl-2 immunohistochemistry in preoperative biopsies as predictors of biochemical recurrence afetr radical prostatectomy. *BJU Int*, 2002; 89:27-32.
154. Che M, DeSilvio M, Pollack A, Grignon DJ, Venkatesan VM, Hanks GE, Prognostic value of abnormal p53 expression in locally adevaced prostate cáncer treated with androgen deprivation and radiotherapy: a study base don RTOG 9202. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007; 69:1117-23.
155. Wu TT, Hsu YS, Wang JS, Lee YH, Huang JK. The role of p53, bcl-2 and E cadherin expression in predicting biochemical relapse for organ confined prostate cáncer in Taiwan. *J urol*, 2003; 170: 78-81.
156. Khor L Y, Moughan J, Al-Saleem T, Hammond EH, Venkatesan V, Rosenthal SA. Bcl-2 and Bax expression predict prostate cáncer outcome in men treated with androgen deprivation and radioterapy on radiation therapy oncology group protocol 92-02. *Clin Cancer Res*, 2007; 13:3585-90.
157. Fossa A, Lilleby W, Fosså SD, Gaudernack G, Torlakovic G, Berner A.. Independent prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in pN0 prostate cáncer undergoing curative radiotherapy. *Int J cáncer*, 2002; 99:100-5.
158. Rhodes DR, Sanda MG, Otte AP, Chinnaiyan AM, Rubin MA Multiples biomarker approach for determining risk of prostate-specific antigen-defined recurrence of prostate cáncer. *J Natl Cancer Inst*, 2003; 95: 661-8.
159. Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epitelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cáncer. *Clin Cancer Res*, 2007; 13:7003-11.
160. Halvorsen OJ, Haukaas S, Høisaeter PA, Akslen LA. Independent prognostic importance of microvessels density in clinicaly localized prostate cáncer.

Anticancer Res, 2000; 20:3791-9.

161. Olivier C, Carballido J. Células tumorales circulantes: aislamiento, cuantificación y relevancia e su traslación a la práctica asistencial. *Actas Urol Esp*. 2010; 34:3-5.
162. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, et al. DD3 (PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 2003; 44:8 –15.
163. Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, Blase A, Bodrug 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.
164. van Gils MP, Hessels D, van Hooij O, Jannink SA, Peelen WP, Hanssen SL, et al. The time-resolved fluorescence-based PCA3 test on urinary sediments after digital rectal examination; a Dutch multicenter validation of the diagnostic performance. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 939–43.
165. Marks LS, Fradet Y, Deras IL, Blase A, Mathis J, Aubin SM, et al. PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology* 2007; 69: 532–5.
166. Laxman B, Morris DS, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R, et al. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 645–9.
167. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005; 310: 644–8.
168. Laxman B, Tomlins SA, Mehra R, Morris DS, Wang L, Helgeson BE, et al. Noninvasive detection of TMPRSS2: ERG fusion transcripts in the urine of men with prostate cancer. *Neoplasia* 2006; 8: 885– 8.
169. Demichelis F, Fall K, Perner S, Andren O, Schmidt F, Setlur SR, et al. TMPRSS2: ERG gene fusión associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* 2007; 26: 4596 –9.
170. Tomlins SA, Rhodes DR, Yu J, Varambally S, Mehra R, Perner S, et al. The role of SPINK1 in ETS rearrangement-negative prostate cancers. *Cancer Cell* 2008; 13: 519 –28.
171. Gonzalgo ML, Nakayama M, Lee SM, De Marzo AM, Nelson WG. Detection

of GSTP1 methylation in prostatic secretions using combinatorial MSP analysis. *Urology* 2004; 63: 414–8.

172. Crocitto LE, Korn D, Kretzner L, Shevchuk T, Blair SL, Wilson TG, et al. Prostate cancer molecular markers GSTP1 and hTERT in expressed prostatic secretions as predictors of biopsy results. *Urology* 2004; 64: 821–5.
173. Rosalinda Eeles, Zsolt Kote-Jarai, Graham G Giles, Ali Amin Al Olama, Michelle Guy. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* 2008; 40: 316-21.
174. Robert J. Klein<sup>1</sup>, Christer Halldén, Angel M Cronin, Alexander Ploner,<sup>4</sup> Fredrik Wiklund,<sup>4</sup> Anders S Bjartell et al. Blood biomarker levels to aid discovery of cancer-related single nucleotide polymorphisms: kallikreins and prostate cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3: 611 -619.
175. Z. Kote-Jarai · A. Amin Al Olama D. Leongamornlert · M. Tymrakiewicz · E. Saunders. Identification of a novel prostate cancer susceptibility variant in the KLK3 gene transcript. *Hum Genet* 2011; 129:687 -694.
176. Xing Xu, Camilla Valtonen-André, Charlotta Sävblom, Christer Halldén, Hans Lilja, and Robert J. Klein. Polymorphisms at the Microseminoprotein-beta (MSMB) Locus Associated With Physiological Variation in Beta-Microseminoprotein ( $\beta$ -MSP) and PSA Levels. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011; 19: 2035 -2042.
177. Robert K. Nam, William W. Zhang, Klotz LH, Trachtenberg J, Jewett MA, Sweet J et al. Variants of the hK2 Protein Gene (KLK2) Are Associated with Serum hK2 Levels and Predict the Presence of Prostate Cancer at Biopsy. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6452-6458.
178. Nam R, W. Zhang, Trachtenberg J, Diamandis E, Toi A, Emami M, et al. Single Nucleotide Polymorphism of the Human Kallikrein-2 Gene Highly Correlates With Serum Human Kallikrein-2 Levels and in Combination Enhances Prostate Cancer Detection. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 21, No 12, 2003: pp 2312-2319.
179. Herrala A, Kurkela R, Porvari K, Isomäki R, Henttu P, Vihko P. Human prostate-specific glandular kallikrein is expressed as an active and an inactive protein. *Clin Chem* 43:279-284, 1997.
180. Parikh H · Deng Z · Yeager M · Boland J · Matthews C · Jia J · et al. A comprehensive resequence analysis of the KLK15–KLK3–KLK2 locus on

chromosome 19q13.33. *Hum Genet* 2010; 127:91–99

181. Eeles R, Kote-Jarai Z, Giles GG, Olama A, Guy M. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* 2008; 40: 316-21.
182. Gilles T, Jacobs K, Yeager M, Kraft P, Wacholder S, Orr N, et al. Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nature Genetics* 2008;40:310 - 315.
183. Cornu JN, Drouin S, Cancel-Tassin G, Bigot P, Azzouzi AR. Impact of Genotyping on Outcome of Prostatic Biopsies: A Multicenter Prospective Study. *Mol med* 2011;17:473-47.
184. Xing Xu, Camilla Valtonen-André, Charlotta Sävblom, Christer Halldén, Hans Lilja, and Robert J. Klein. Polymorphisms at the Microseminoprotein-beta (MSMB) Locus Associated With Physiological Variation in Beta- Microseminoprotein ( $\beta$ -MSP) and Prostate Specific Antigen (PSA) Levels. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 August; 19: 2035–2042.
185. Klein R, Halldén C, Cronin A, Ploner A, Wiklund F, Bjartell A, et al. Blood biomarker levels to aid discovery of cancer-related single nucleotide polymorphisms: kallikreins and prostate cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010 May; 3: 611–619.
186. Lishan Wang, Weidong Zang, Yunxia Sang, Dongli Xie, Li Wei, Weidong Ji, et al. Association of Polymorphism rs198977 in Human Kallikrein-2 Gene (KLK2) with Susceptibility of Prostate Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2013; 8: e65651.
187. Raj Satkunasivam, William Zhang, John Trachtenberg, Ants Toi, Changhong Yu, Eleftherios Diamandis, et al. Human kallikrein-2 gene and protein expression predicts prostate cancer at repeat biopsy. *Springerplus.* 2014; 3: 295.
188. Daniel LJ Thorek, Michael J Evans, Sigrid V Carlsson, David Ulmert, Hans Lilja. *Thromb Haemost.* Prostate Specific Kallikrein-related Peptidases and Their Relation to Prostate Cancer Biology and Detection; Established Relevance and Emerging Roles. *PMC* 2013 September; 110: 484–492.
189. Silletti JP, Gordon GJ, Bueno R, Jaklitsch M, Loughlin KR. Prostate biopsy: past, present, and future. *Urology.* Mar; 2007 69:413–416.

190. Hodge KK, McNeal JE, Terris MK, Stamey TA. Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate. *The Journal of urology*. Jul; 1989 142(1):71–74.
191. Stamey TA. Making the most out of six systematic sextant biopsies. *Urology* 1995; 45: 2-12.
192. Minamida S, Satoh T, Tabata K, Kimura M, Tsumura H, Kurosaka S. Prevalence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* before and incidence of acute bacterial prostatitis after biopsy. *Urology* 2011; 78: 1235-9.
193. Aus G, Abbou CC, Pacik D, Schmid HP, van Poppel H, Wolff JM et al. EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol* 2001; 40: 97-101.
194. Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP et al. EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol* 2008; 53:68-80.
195. Remzi M, Dobrovits M, Reissigl A, Ravery V, Waldert M, Wiunig C, et al. European Society for Oncological Urology (ESOU). Can Power Doppler enhanced transrectal ultrasound guided biopsy improve prostate cancer detection on first and repeat prostate biopsy? *Eur Urol*. 2004 Oct; 46:451-6.
196. Presti JC Jr, O'Dowd GJ, Miller MC, Mattu R, Veltri RW. Extended peripheral zone biopsy schemes increase cancer detection rates and minimize variance in prostate specific antigen and age related cancer rates: results of a community multi-practice study. *J Urol*. 2003 Jan; 169:125-9.
197. K. Eichler, S. Hempel, J. Wilby, L. Myers, L. M. Bachmann and J. Kleijnen, Diagnostic value of systematic biopsy methods in the investigation of prostate cancer: a systematic review. *J Urol*, 175: 1605-1612, 2006
198. Stephenson SK, Chang E, Marks L. Screening & Detection Advances in MRI-Guided Prostate Biopsy. *Urol Clin North Am*. 2014 May; 41: 315–326.
199. Cooperberg MR, Broering JM, Kantoff PW, Carroll PR. Contemporary trends in low risk prostate cancer: risk assessment and treatment. *J Urol*. Sep; 2007 178:S14–19. Pt 2.
200. Rifkin MD, Kurtz AB, Goldberg BB. Prostate biopsy utilizing transrectal ultrasound guidance: diagnosis of non palpable cancers. *J Ultrasound Med* 1983; 2: 165-7.

201. Lee F, Littrup PJ, Torp-Pedersen ST, Mettlin C, McHugh TA, Gray JM et al. Prostate cancer: comparison of digital rectal examination for screening. *Radiology* 1988; 168:389-94.
202. Rodriguez-Patron R, Mayayo T, Alonso M, Burgos FJ y Lenni A. Resultados de una serie de biopsias transrectales ecodirigidas en 6000 pacientes. Parte I: anatomía patológica, tacto rectal, ecografía transrectal y PSA. *Arch Esp Urol* 2005; 58:611-22.
203. Tareen B, Godoy G, Sankin A, Temkin S, Lepor H, Taneja SS. Can contemporary transrectal prostate biopsy accurately select candidates for hemi-ablative focal therapy of prostate cancer? *BJU Int* 2009; 104:195-9.
204. Cochlin DL, Ganatra RH, Griffiths DF. Elastography in the detection of prostatic cancer. *Clin Radiol* 2002; 57: 1014-20.
205. Pallwein L, Aigner F, Faschingbauer R, Pallwein E, Pinggera G, Bartsch G, et al. Prostate cancer diagnosis: value of real time elastography. *Abdom Imaging* 2008; 33: 729-35.
206. Brock M, von Bodman C, Sommerer F, Löppenber B, Klein T, Deix T, et al. Comparison of real-time elastography with grey-scale ultrasonography for detection of organ-confined prostate cancer and extra capsular extension: a prospective analysis using whole mount sections after radical prostatectomy. *BJU Int*. 2011 Oct; 108.
207. Zhang Y, Tang J, Li YM, Fei X, He EH, Li QY, Shi HY. The contribution of strain patterns in characterization of prostate peripheral zone lesions at transrectal ultrasonography. *Acta Radiol*. 2012 Feb 1; 53:119-26.
208. Simmons LA, Autier P, Zát'ura F, Braeckman J, Peltier A, Romic I et al. Detection, localisation and characterisation of prostate cancer by prostate HistoScanning(™) *BJU Int*. 2012 Jul; 110:28-35.
209. Loch T. Prostate cancer diagnostics: innovative imaging in case of multiple negative biopsies. *World J Urol*. 2011 Oct;29:607-14
210. Heijmink SW1, Fütterer JJ, Strum SS, Oyen WJ, Frauscher F, Witjes JA, Barentsz JO. State-of-the-art urologic imaging in the diagnosis of prostate cancer. *Acta Oncol*. 2011 Jun; 50 Suppl 1:25-38.
211. Kurhanewicz J1, Vigneron D, Carroll P, Coakley F. Multiparametric magnetic resonance imaging in prostate cancer: present and future. *Curr Opin Urol*. 2008 Jan; 18:71-7.

212. Barentsz JO, Richenberg J, Clements R, Choyke P, Verma S, Villeirs Get al; European Society of Urogenital Radiology. ESUR prostate MR guidelines 2012. *Eur Radiol.* 2012 Apr;22:746-57
213. Kurhanewicz J, Vigneron DB, Hricak H, Narayan P, Carroll P, Nelson SJ. Three-dimensional H-1 MR spectroscopic imaging of the in situ human prostate with high (0.24-0.7-cm<sup>3</sup>) spatial resolution *Radiology.* 1996 Mar;198:795-805
214. Shukla-Dave A, Hricak H, Kattan MW, Pucar D, Kuroiwa K, Chen HN, et al. The utility of magnetic resonance imaging and spectroscopy for predicting insignificant prostate cancer: an initial analysis. *BJU Int.* 2007 Apr; 99:786-93.
215. Pinto F, Totaro A, Calarco A, Sacco E, Volpe A, Racioppi M, et al. Imaging in prostate cancer diagnosis: present role and future perspectives *Urol Int.* 2011; 86:373-82.
216. Lawrentschuk N, Fleshner N. The role of magnetic resonance imaging in targeting prostate cancer in patients with previous negative biopsies and elevated prostate-specific antigen levels. *BJU Int.* 2009 Mar; 103:730-3.
217. Hambroek T, Somford DM, Hoeks C, Bouwense SA, Huisman H, Yakar D, et al. Magnetic resonance imaging guided prostate biopsy in men with repeat negative biopsies and increased prostate specific antigen. *J Urol.* 2010 Feb; 183:520-7.
218. Park BK, Park JW, Park SY, Kim CK, Lee HM, Jeon SS, et al. Prospective evaluation of 3-T MRI performed before initial transrectal ultrasound-guided prostate biopsy in patients with high prostate-specific antigen and no previous biopsy. *AJR Am J Roentgenol.* 2011 Nov; 197:W876-81.
219. Haffner J1, Lemaitre L, Puech P, Haber GP, Leroy X, Jones JS, Villers A. Role of magnetic resonance imaging before initial biopsy: comparison of magnetic resonance imaging-targeted and systematic biopsy for significant prostate cancer detection. *BJU Int.* 2011 Oct;108.
220. Ahmed HU1, Kirkham A, Arya M, Illing R, Freeman A, Allen C, Emberton M. Is it time to consider a role for MRI before prostate biopsy? *Nat Rev Clin Oncol.* 2009 Apr; 6:197-206.
221. Abd-Alazeez M, Alex Kirkham, Hashim U. Ahmed, Manit Arya, Eleni Anastasiadis, Susan C et al. Performance of multi-parametric MRI in men at risk of prostate cancer prior to first biopsy: a paired validating cohort study

using template prostate mapping biopsies as reference standard. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2014 March; 17: 40–46.

222. Pinto PA, Chung PH, Rastinehad AR, Baccala AA Jr, Kruecker J, Benjamin CJ, et al. Magnetic resonance imaging/ultrasound fusion guided prostate biopsy improves cancer detection following transrectal ultrasound biopsy and correlates with multiparametric magnetic resonance imaging. *J Urol.* 2011 Oct; 186:1281-5.
223. Signoretti S, Waltregny D, Dilks J. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Surg Pathol.* 2000; 157:1769-1775.
224. Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB and the 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 :1128-1242.
225. Montironi R, Mazzucchelli R, Scattoni V, Bostwick DG. Pathological findings in TRUS prostatic biopsy: diagnostic prognostic and therapeutic importance. *Eur Urol. Suppl.* 2002; 1: 60-75.
226. Van der Kwast T, Bubendorf L, Mazerolles C, Raspollini MR, Van Leenders GJ, Pihl CG, et al. Guidelines on processing and reporting of prostate biopsies: the 2013 update of the pathology committee of the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) *Virchows Arch* 2013 Sep; 463:367-77.
227. Wills ML, Sauvageot J, Partin AW, Gurganus R, Epstein JI. Ability of sextant biopsies to predict radical prostatectomy stage. *Urology.* 1998; 51:759-764.
228. O' Dowd GJ, Miller MC, Orozco R, Veltri RW. Analysis of repeated biopsy results within 1 year after a noncancer diagnosis. *Urology* 2000; 55:553-559.
229. Alexander EE, Qian J, Wollan PC, Myers RP, Bostwick DG. Prostatic intraepithelial neoplasia does not appear to raise serum prostate-specific antigen concentration. *Urology* 1996; 47:693-698.
230. Morote J, Raventos CX, Encabo G, Lopez M, de Torres IM. Effect of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia on total and percent free serum prostatic-specific antigen. *Eur Urol.* 2000; 37:456-459.

231. Schlesinger C, Bostwick DG, Iczkowsky KA. High grade prostatic intraepithelial neoplasia and atypical small acinar proliferation. Predictive value for cancer in current practice. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29:1201-1207.
232. Moore CK, Karikehalli S, Nazeer T, Fisher HA, Kaufman RP Jr, Mian BM.. Prognostic significance of high grade prostatic intraepithelial neoplasia and atypical small acinar proliferation in the contemporary era. *J Urol* 2005 Jan; 173:70-2.
233. Lemaitre L, Puech P, Poncelet E, Bouyé S, Leroy X, Biserte J.et al. Dynamic contrast-enhanced MRI of anterior prostate cancer: morphometric assessment and correlation with radical prostatectomy findings. *Eur Radiol* 2009 Feb; 19:470-80.
234. De Torres Ramírez I. Factores pronósticos y predictivos del carcinoma de próstata en la biopsia prostática Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Vall'dHebrón. Barcelona. *Actas Urol Esp.* 2007;31:1025-1044
235. Epstein JI. Interpretation of prostate biopsies. 3er Ed. Philadelphia, PA. Lippincott Williams and Wilkins, 2002.
236. Epstein JI. Diagnosis and reporting of limited adenocarcinoma of the prostate on needle.biopsy. *Mod Pathol.* 2004; 17:307-315.
237. Schlesinger C, Bostwick DG, Iczkowsky KA. High grade prostatic intraepithelial neoplasia and atypical small acinar proliferation. Predictive value for cancer in current practice. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29:1201-1207.
238. Palapattu GS, Sutcliffe S, Bastian PJ, Platz EA, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis.* 2005; 26:1170-1181.
239. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI. Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostate carcinogenesis. *Am J Pathol.* 1999;155: 1985-1992
240. Ruska KM, Sauvageot J, Epstein JI. Histology and celular kinetics of prostatic atrophy. *Am J Surg Pathol.* 1998; 22 :1073-1077.
241. Billis A, Magna LA. Inflammatory atrophy of the prostate. Prevalence and significance. *Arch Pathol Lab Med.* 2003; 127:840-844.
242. Eble JN, Sauter G, Epstein JI. World Health Organization Classification of Tumors. Tumors of the urinary system and male genital organs. Pathology

and Genetics. IARC Press, Lyon 2004 pp.160-161.

243. Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB and the 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 :1128-1242.
244. Billis A, Guimaraes MS, Freitas LL, Meirelles L, Magna LA, Ferreira U. The impact of the 2005 international society of urological pathology consensus conference on standard Gleason grading of prostatic carcinoma in needle biopsies. *J Urol* 2008; 180:548-52.
245. Sebo TJ, Chevillie JC, Riehle DL, Lohse CM, Pankratz VS, Myers RP, et al. Predicting prostate carcinoma volume and stage at radical prostatectomy by assessing needle biopsy specimens for percent surface area and cores positive for carcinoma, perineural invasion, Gleason score, DNA ploidy and proliferation, and preoperative serum prostate specific antigen: a report of 454 cases. *Cancer* 2001 Jun; 91:2196-204.
246. Freedland SJ, Terris MK, Csathy GS, Kane CJ, Amling CL, Presti JC Jret al.; Search Database Study Group. Preoperative model for predicting prostate specific antigen recurrence after radical prostatectomy using percent of biopsy tissue with cancer, biopsy Gleason grade and serum prostate specific antigen. *J Urol* 2004 Jun; 171:2215-20.
247. Brimo F, Vollmer RT, Corcos J, Kotar K, Bégin LR, Humphrey PA, et al. Prognostic value of various morphometric measurements of tumour extent in prostate needle core tissue. *Histopathology* 2008 Aug; 53:177-83.
248. Herkommer K, Kuefer R, Gschwend JE, Hautmann RE, Volkmer BG. Pathological T0 prostate cancer without neoadjuvant therapy: clinical presentation and follow-up. *Eur Urol* 2004 Jan; 45:36-41.
249. Trpkov K, Gao Y, Hay R, Yimaz A. No residual cancer on radical prostatectomy after positive 10-core biopsy: incidence, biopsy findings, and DNA specimen identity analysis. *Arch Pathol Lab Med* 2006 Jun; 130:811-6.
250. Turkbey B, Pinto PA, Mani H, Bernardo M, Pang Y, McKinney YL, et al. Prostate cancer: value of multiparametric MR imaging at 3 T for detection-histopathologic correlation. *Radiology* 2010 Apr; 255:89-99.
251. Partin AW, Mangold LA, Lamm DM, Walsh PC, Epstein JI, Pearson JD. Contemporary update of the prostate cancer staging nomograms (Partin

tables) for the new millennium. *Urology* 2001 Dec; 58(6):843-8.

252. Harnden P, Shelley MD, Coles B, Staffurth J, Mason MD. Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncology* 2007 May; 8:411-9.
253. Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C (eds) TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 7th edn. Wiley-Blackwell, 2009 Dec; pp. 243-248.
254. Magi-Galluzzi C, Evans AJ, Delahunt B, Epstein JI, Griffiths DF, van der Kwast TH et al.; ISUP Prostate Cancer Group. International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Handling and Staging of Radical Prostatectomy Specimens. Working group 3: extraprostatic extension, lymphovascular invasion and locally advanced disease. *Mod Pathol* 2011 Jan; 24:26-38.
255. Aydin H, Tsuzuki T, Hernandez D, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI.. Positive proximal (bladder neck) margin at radical prostatectomy confers greater risk of biochemical progression. *Urology* 2004 Sep; 64:551-5.
256. Ploussard G, Rotondo S, Salomon L. The prognostic significance of bladder neck invasion in prostate cancer: is microscopic involvement truly a T4 disease? *BJU Int* 2009; 105:776-81.
257. Stamey TA, Yemoto CM, McNeal JE, Sigal BM, Johnstone IM.. Prostate cancer is highly predictable: a prognostic equation based on all morphological variables in radical prostatectomy specimens. *J Urol* 2000 Apr; 163:1155-60.
258. Epstein JI, Amin M, Boccon-Gibod L, Egevad L, Humphrey PA, Mikuz G, et al. Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2005 May; 216:34-63.
259. Evans AJ, Henry PC, Van der Kwast TH, Tkachuk DC, Watson K, Lockwood GA, et al. Interobserver variability between expert urologic pathologists for extraprostatic extension and surgical margin status in radical prostatectomy specimens. *Am J Surg Pathol* 2008 Oct; 32:1503-12.
260. Chuang AY, Epstein JI. Positive surgical margins in areas of capsular incision in otherwise organconfined disease at radical prostatectomy: histologic features and pitfalls. *Am J Surg Pathol* 2008 Aug; 32:1201-6.

261. Gosselaar C, Roobol MJ, Roemeling S, Schröder FH. The role of the digital rectal examination in subsequent screening visits in the European randomized study of screening for prostate cancer (ERSPC), Rotterdam. *Eur Urol* 2008 Sep; 54:581-8.
262. Epstein JI, Partin AW, Potter SR, Walsh PC. Adenocarcinoma of the prostate invading the seminal vesicle: prognostic stratification based on pathologic parameters. *Urology*. 2000, 56: 283-288.
263. Kench JG, Clouston DR, Delprado W, Eade T, Ellis D, Horvath LG, et al. Prognostic factors in prostate cancer. Key elements in structured histopathology reporting of radical prostatectomy specimens. *Pathology*. 2011, 43: 410-419.
264. Kattan MW, Wheeler TM, Scardino PT. Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Clin Oncol*. 1999, 17: 1499-1507.
265. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 1998 Sep 16; 280:969-74.
266. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010 Jun;17:1471-4
267. Lughezzani G, Budäus L, Isbarn H, Sun M, Perrotte P, Haese A, et al. Head-to-head comparison of the three most commonly used preoperative models for prediction of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Eur Urol*. 2010 Apr; 57:562-8.
268. Bhatnagar, V. and R.M. Kaplan, Treatment options for prostate cancer: evaluating the evidence. *Am Fam Physician*, 2005, 71: 1915-1922.
269. Large MC and Eggener SE. Active surveillance for low-risk localized prostate cancer. *Oncology*. 2009, 23: 974-979.
270. Klotz L, Zhang L, Lam A, Nam R, Mamedov A, Loblaw A. Clinical results of long-term follow-up of a large, active surveillance cohort with localized prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2010, 28: 126-131.
271. Karnes RJ, Hatano T, Blute ML, Myers RP. Radical prostatectomy for high-risk prostate cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2010, 40: 3-9.

272. Bill-Axelsson A, Holmberg L, Filén F, Ruutu M, Garmo H, Busch C, et al. Scandinavian Prostate Cancer Group Study Number 4. Radical prostatectomy versus watchful waiting in localized prostate cancer: the Scandinavian prostate cancer group-4 randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008, 100: 1144-1154.
273. Shelley MD, Kumar S, Wilt T, Staffurth J, Coles B, Mason MD. A systematic review and metaanalysis of randomised trials of neo-adjuvant hormone therapy for localised and locally advanced prostate carcinoma. *Cancer Treat Rev.* 2009, 35: 9-17.
274. Messing EM, Manola J, Yao J, Kiernan M, Crawford D, Wilding G, et al. Eastern Cooperative Oncology Group study EST 3886. Immediate versus deferred androgen deprivation treatment in patients with node-positive prostate cancer after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy. *Lancet Oncol.* 2006, 7: 472-479.
275. McLeod DG, Iversen P, See WA, Morris T, Armstrong J, Wirth MP; Casodex Early Prostate Cancer Trialists' Group. Bicalutamide 150 mg plus standard care vs standard care alone for early prostate cancer. *BJU Int.* 2006, 97: 247-254.
276. Bolla M, van Poppel H, Collette L, van Cangh P, Vekemans K, Da Pozzo L, et al; European Organization for Research and Treatment of Cancer. Postoperative radiotherapy after radical prostatectomy: a randomised controlled trial (EORTC trial 22911) *Lancet.* 2005 Aug 13- 19; 366(9485): 572-578.
277. Briganti A, Larcher A, Abdollah F, Capitanio U, Gallina A, Suardi N, et al. Updated Nomogram Predicting Lymph Node Invasion in Patients with Prostate Cancer Undergoing Extended Pelvic Lymph Node Dissection: The Essential Importance of Percentage of Positive Cores. *Eur Urol* 2012 Mar; 61:480-7.
278. Bolla M, de Reijke TM, Van Tienhoven G, Van den Bergh AC, Oddens J, Poortmans PM, et al. EORTC Radiation Oncology Group and Genito-Urinary Tract Cancer Group. Duration of androgen suppression in the treatment of prostate cancer. *N Engl J Med.* 2009, 360: 2516- 2527.
279. Viani GA, Stefano EJ, Afonso SL. Higher-than-conventional radiation doses in localized prostate cancer treatment: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009 Aug; 74:1405-18.
280. Peeters ST, Heemsbergen WD, Koper PCM, van Putten WL, Slot A, Dielwart

MF, et al. Dose-response in radiotherapy for localized prostate cancer: results of the Dutch multicenter randomized phase III trial comparing 68 Gy of radiotherapy with 78 Gy. *J Clin Oncol* 2006 May; 24:1990-6.

281. Taira AV, Merrick GS, Butler WM, Galbreath RW, Lief J, Adamovich E, Wallner KE. Long-term outcome for clinically localized prostate cancer treated with permanent interstitial brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011, 79: 1336-1342.
282. Boorjian SA, Karnes RJ, Viterbo R, Rangel LJ, Bergstralh EJ, Horwitz EM et al. Long-term survival after radical prostatectomy versus external-beam radiotherapy for patients with high-risk prostate cancer. *Cancer.* 2011 Jul 1; 117:2883-91.
283. Adolfsson J, Tribukait B, Levitt S. The 20-yr outcome in patients with well- or moderately differentiated clinically localized prostate cancer diagnosed in the pre-PSA era: the prognostic value of tumour ploidy and comorbidity. *Eur Urol* 2007 Oct; 52:1028-35.
284. Briganti A, Karnes JR, Da Pozzo LF, Cozzarini C, Gallina A, Suardi N, et al. Two positive nodes represent a significant cut-off value for cancer specific survival in patients with node positive prostate cancer. A new proposal based on a two-institution experience on 703 consecutive N+ patients treated with radical prostatectomy, extended pelvic lymph node dissection and adjuvant therapy. *Eur Urol* 2009 Feb; 55:261-70.
285. Sharifi N, Gulley JL, Dahut WL. Androgen deprivation therapy for prostate cancer. *JAMA.* 2005, 294: 238-244.
286. Harris WP, Mostaghel EA, Nelson PS, Montgomery B. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol.* 2009, 6: 76-85.
287. Shahinian VB, Kuo YF, Freeman JL, Goodwin JS. Risk of fracture after androgen deprivation for prostate cancer. *N Engl J Med.* 2005, 352: 154-164.
288. Berthold DR, Pond GR, Roessner M, de Wit R, Eisenberger M, Tannock A. TAX-327 investigators. Treatment of hormone-refractory prostate cancer with docetaxel or mitoxantrone: relationships between prostate-specific antigen, pain, and quality of life response and survival in the TAX-327 study. *Clin Cancer Res* 2008 May; 14: 2763-7.
289. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, et al. COU-AA-

- 301 Investigators. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 2011 May; 364:1995-2005.
290. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, et al. AFFIRM Investigators. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med* 2012 Sep;367:1187-97
291. Saad F, Gleason DM, Murray R, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, et al. A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone refractory metastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002 Oct; 94:1458-68.
292. Sei J. Lee, Karla Lindquist, MS Mark R. Segal, Kenneth E. Covinsky, Development and Validation of a Prognostic Index for 4-Year Mortality in Older Adults. *AMA*, February 15, 2006-Vol 295, No. 7
293. Guías de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO), 2014.
294. Pablo Stiefel a, José Salvador García-Morillo a, José Villar. Características clínicas, bases celulares y moleculares de la hipertensión arterial del anciano Unidad Clínico-Experimental de Riesgo Vascular (UCAMI-UCERV) *Med Clin (Barc)* 2008;131:387-95
295. Lars Rydén, Peter J. Grant, Stefan D. Anker, Christian Berne, Francesco Cosentino, Nicolas Danchin, et al. Guía de práctica clínica de la ESC sobre diabetes, prediabetes y enfermedad cardiovascular, en colaboración con la European Association for the Study of Diabetes. *Rev Esp Cardiol*. 2014;67:136.e1-e56
296. Intra-individual short-term variability of prostate-specific antigen and other kallikrein markers in a serial collection of blood from men under evaluation for prostate cancer. Christensson A, Bruun L, Björk T, Cronin AM, Vickers AJ, Savage CJ, Lilja H. *BJU Int*. 2011 Jun; 107:1769-74.
297. Braun K, Sjoberg DD, Vickers AJ, Lilja H, Bjartell AS. A Four-kallikrein Panel Predicts High-grade Cancer on Biopsy: Independent Validation in a Community Cohort. *Eur Urol*. 2015 May 12. pii: S0302-2838:00330-9. doi: 10.1016/j.eururo.2015.04.028.
298. Bryant RJ, Sjoberg DD, Vickers AJ, Robinson MC, Kumar R, Marsden L, Davis M, et al. Predicting High-Grade Cancer at Ten-Core Prostate Biopsy Using Four Kallikrein Markers Measured in Blood in the ProtecT Study. *Natl Cancer Inst*. 2015 Apr 11; 1 pii: djv095. doi: 10.1093/jnci/djv095. Print

2015 Jul.

299. Stattin P, Vickers AJ, Sjoberg DD, Johansson R, Granfors T, Johansson M, et al. Improving the Specificity of Screening for Lethal Prostate Cancer Using Prostate-specific Antigen and a Panel of Kallikrein Markers: A Nested Case-Control Study. *Eur Urol*. 2015 Feb 11. pii: S0302-2838:00024-X.
300. [www.cancer.gov/](http://www.cancer.gov/)

## 9 ABREVIATURAS

---



<b>AMARC</b>	Alfa-Metilacin-Coenzima A Racemasa
<b>AR</b>	Receptor Androgénico
<b>ASAP</b>	Proliferación Acinar Atípica
<b>AUC</b>	Área bajo la curva
<b>BFGF</b>	Factor de crecimiento fibroelástico básico
<b>BPSA</b>	PSA asociado a HBP
<b>CDA</b>	Coeficiente de Difusión Aparente.
<b>CDK</b>	Complejos ciclina-quinasa
<b>CP</b>	Cáncer de Próstata
<b>CTC</b>	Células Tumorales Circulantes
<b>DE</b>	Disfunción Eréctil
<b>DHT</b>	Dihidrotestosterona
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>EGFR</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>ELRT</b>	Elastografía en tiempo real
<b>ERSPC</b>	European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer.
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropina
<b>GSTP1</b>	Glutación S-transferasa pi 1
<b>GWAS</b>	Genome Wide Association

<b>HAA</b>	Hiperplasia Adenomatosa Atípica
<b>HBP</b>	Hiperplasia Benigna de Próstata
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento hematopoyético
<b>hK2</b>	Proteína glandular humana 2
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>HWE</b>	Equilibrio Hardy-Weinberg
<b>IARC</b>	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento insulínico 1
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal
<b>LH</b>	Hormona Luteinizante
<b>NCNN</b>	National Cancer Comprehensive Network
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PCLO</b>	Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial
<b>PCPT</b>	Prostate Cancer Prevention Trial
<b>PHI</b>	Prostate health Index
<b>PIA</b>	Atrofia proliferativa inflamatoria
<b>PINAG</b>	Neoplasia Intraepitelial prostática de alto grado
<b>PR</b>	Prostatectomía radical
<b>PSA</b>	Antígeno prostático específico.
<b>RDT</b>	Radioterapia

<b>REDUCE</b>	Reduction by Dutasteride of Prostate Cancer Events
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>SEER</b>	Surveillance, Epidemiology and End Results Program
<b>SNP</b>	Polimorfismo genético
<b>STUI</b>	Síntomas del Tracto Urinario Inferior
<b>TMPRSS2</b>	Proteasa transmembrana serina 2
<b>TNM</b>	Tumor Node Metastasis
<b>UICC</b>	Unión Internacional Contra el Cáncer
<b>VEGF</b>	Factor crecimiento vascular endotelial
<b>VPP</b>	Valor Predictivo Positivo
<b>α 1ACT</b>	Alfa 1- antitripsina
<b>α 2M</b>	Alfa2-macroglobulina
<b>±DE</b>	Desviación estándar



## **10 ANEXOS**

---



## **ANEXO 1**



D. Ricardo Díaz Abad Secretario del CEIC del Hospital Universitario Severo Ochoa,

## CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado el Proyecto de Investigación titulado:

***“Evaluación de los polimorfismos identificados en el gen de la calicreína humana 2 (KLK2) y la presencia de cáncer de próstata. Relación con los niveles séricos de la calicreína glandular humana 2 (hk2) y las formas moleculares del antígeno prostático específico”***

y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.

El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Y que este Comité acepta que dicho proyecto de investigación sea llevado a cabo como investigadora principal por la **Dra. Silvia García Barreras** del Servicio de **Urología** del **Hospital Universitario Severo Ochoa**.

Además, se hace constar que:

1º. El CEIC, tanto en su composición, como en los PNTs cumple las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con el RD 223/2004, y su composición actual es la siguiente:

2º. La composición actual del CEIC es la siguiente:

D. Amparo Lucena Campillo	Presidenta, H.U Severo Ochoa
D <sup>a</sup> . Beatriz Medina Bustillo	Vicepresidenta. Atención Primaria
D. Ricardo Díaz Abad	Secretario Técnico, H.U Severo Ochoa.
D <sup>a</sup> . Ana López Martín	Vocal, H. U Severo Ochoa
D. Adolfo Ramos Luengo	Vocal H. U Severo Ochoa
D. Carlos González Juárez	Vocal, H. U Severo Ochoa
D <sup>a</sup> . Isabel Portero Sánchez	Vocal H. U Severo Ochoa
D <sup>a</sup> Ana Isabel Martín Cuesta	Vocal lego, H.U Severo Ochoa.
D. Jesús Rodríguez González	Vocal lego, Doctor en Derecho.
D <sup>a</sup> . M <sup>a</sup> Teresa Rodríguez Monje	Vocal, Atención Primaria
D <sup>a</sup> . Magdalena Gutiérrez Camacho	Vocal, Hospital Severo Ochoa.
D <sup>a</sup> . Lucia Llanos Jiménez	Vocal, Farmacólogo Clínico.
D. Miguel Cervero Jiménez	Vocal, Representante de la Comisión de Investigación H. U Severo Ochoa

Lo que firmo en Leganes a 29 de febrero de 2012

  
Fdo: Ricardo Díaz Abad





## **ANEXO 2**



<p>Polimorfismos en el gen de la calicreína humana 2 (KLK2) y el desarrollo de cáncer de próstata. Relación con la proteína glandular humana 2(hK2) y las formas libre, total y ligada del PSA.</p> <p><b>CÓDIGO:</b></p> <p><b>Nº PACIENTE:</b>                      <b>FECHA:</b></p>	<p>Investigador: SILVIA GARCÍA BARRERAS. HOSPITAL SEVERO OCHOA</p>
	<p>NºHISTORIA PACIENTE</p>

## CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

- Ante cualquier duda contactar con la Dra. García Barreras:
  - [silviagb18@gmail.com](mailto:silviagb18@gmail.com)
  - Servicio de Urología, Hospital Universitario Severo Ochoa, Leganés.

## INSTRUCCIONES GENERALES PARA EL INVESTIGADOR

- Use bolígrafos de tinta negra.
- Asegúrese de que todo lo que escriba está claro y legible, preferiblemente en letra de imprenta.
- Para corregir cualquier error, tache con una línea el ítem erróneo de forma que quede legible, y escriba al lado el dato correcto.
- Ponga sus iniciales y fecha en todos los cambios que realice.
- No utilice fluidos correctores.
- Use el formato de la fecha indicado: dd/mm/aaaa (día, mes, año).
- Si un dato histórico o parte de éste es imposible de obtener, por favor, tache la casilla correspondiente.
- Si algún dato no aplica: poner N/A.
- Si es imposible obtener alguna información, por favor, indique la razón por la cual dicha información no está disponible.
- -Consta de cuatro partes:
  - Consentimiento informado
  - Criterios de selección
  - Antecedentes personales
  - Informe de ecografía transrectal\*\*

\*\* Esta última parte ha de ser adjuntada en el momento en el que se realice la biopsia transrectal y se redacte el correspondiente informe.

\*Por favor, asegúrese de que ha sido cumplimentada la totalidad del Cuaderno de Recogida de datos.

Polimorfismos en el gen de la calicreína humana 2 (KLK2) y el desarrollo de cáncer de próstata. Relación con la proteína glandular humana 2(hK2) y las formas libre, total y ligada del PSA. <b>CÓDIGO:</b>	Investigador: SILVIA GARCÍA BARRERAS. HOSPITAL SEVERO OCHOA
	Nº HISTORIA PACIENTE

## INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE Y FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO CON TÍTULO:

### POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA CALICREÍNA HUMANA 2 (KLK2) Y EL DESARROLLO DE CÁNCER DE PRÓSTATA. RELACIÓN CON LA PROTEÍNA GLANDULAR HUMANA 2(HK2) Y LAS FORMAS LIBRE, TOTAL Y LIGADA DEL PSA.

Hospital Severo Ochoa  
Servicio de Urología

El paciente \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ años de edad, con DNI/NIE \_\_\_\_\_, tras haber sido informado por el Dr. /Dra. \_\_\_\_\_, con número de colegiado \_\_\_\_\_, declara que se le ha suministrado y que a través de este documento ha podido leer y ha comprendido la información correspondiente a la participación en el estudio llevado a cabo en el Hospital Severo Ochoa sobre la asociación de una mutación genética y el riesgo de padecer cáncer de próstata.

#### INTRODUCCIÓN

Le invitamos a participar en un estudio. Para decidir si desea o no participar en este estudio usted tiene derecho a saber cuál es el objetivo del mismo, cuál es la selección de los pacientes, los procedimientos diagnóstico que se emplearán y los riesgos asociados a dicha intervención. Tanto si participa como si no desea participar recibirá el mismo trato por parte del personal sanitario.

#### OBJETIVO

El cáncer de próstata es el tumor maligno más frecuente en la población masculina de los países industrializados, por lo que se han desarrollado programas de cribado para la detección precoz.

El antígeno prostático específico (PSA) es el marcador tumoral más utilizado para la detección del cáncer de próstata, incrementando el número de casos diagnosticados.

En los últimos años se están realizando investigaciones con otra proteína llamada hk2, sintetizada por la próstata, y una mutación genética, que parecen estar asociados con padecer cáncer de próstata. El objetivo es analizar la relación entre la mutación genética, los niveles en sangre de hk2 y las formas moleculares del PSA.

## PROCEDIMIENTO

El estudio se lleva a cabo en pacientes varones que precisan la biopsia prostática para detección precoz del cáncer de próstata. Para determinar el marcador objetivo del estudio es preciso extraer tres tubos de 20ml de sangre venosa mediante punción. No necesita preparación especial. Entre los efectos negativos puede producirse hematoma, flebitis y dolor en la zona de punción. El resto de procedimientos son los habituales del servicio de Urología del Hospital Severo Ochoa ajustados a los protocolos de detección precoz del cáncer de próstata

El paciente con este estudio no obtendrá ningún beneficio terapéutico directo, pero su participación servirá para obtener información que nos permita disminuir el número de procedimientos a realizar en un futuro a otros pacientes para diagnosticar cáncer de próstata, y evitar las complicaciones y molestias asociadas.

Los investigadores, y el centro hospitalario donde se realiza el estudio, no obtendrán en ningún caso beneficio económico.

Mediante la firma de este documento, el paciente da su aprobación para la participación en dicho estudio, así como para la utilización de la información contenida en su Historia Clínica, con la única y exclusiva finalidad de presentar la mayor disponibilidad de datos posible en la investigación.

Los datos obtenidos serán manejados con la máxima confidencialidad y de acuerdo con la ley 15/99 de Protección de Datos de carácter personal.

AUTORIZO a que el personal médico utilice, para fines de investigación las muestras de sangre obtenidas mediante punción y la información incluida en mi historia clínica.

Me reservo expresamente el derecho a revocar mi consentimiento en cualquier momento.

En Madrid a \_\_\_\_\_ (LUGAR Y FECHA)

EL PACIENTE

EL MÉDICO

DNI/NIE:

Nº DE COLEGIADO:

## REVOCACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

A través de la siguiente firma, el paciente \_\_\_\_\_,  
DNI/NIE \_\_\_\_\_ desestima su participación en la investigación realizada en el Hospital Severo Ochoa sobre la asociación del polimorfismo con el cáncer de próstata así como desautoriza la utilización de la información contenida en su Historia Clínica para el siguiente estudio.

En Madrid a \_\_\_\_\_ (LUGAR Y FECHA)

EL PACIENTE

EL MÉDICO

DNI/NIE

Nº DE COLEGIADO

Polimorfismos en el gen de la calicreína humana 2 (KLK2) y el desarrollo de cáncer de próstata. Relación con la proteína glandular humana 2(hK2) y las formas libre, total y ligada del PSA. <b>CÓDIGO:</b>	Investigador: SILVIA GARCÍA BARRERAS. HOSPITAL SEVERO OCHOA
	Nº HISTORIA PACIENTE

## CRITERIOS DE SELECCIÓN

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

	SI	NO
Pacientes que cumplan criterios de realización de biopsia prostática según protocolos de cribado poblacional del Hospital Severo Ochoa, basados en las actuales guías europeas. <ul style="list-style-type: none"> <li>- tacto rectal sospechoso: si presenta un nódulo palpable, induración, asimetría o borramiento del surco.</li> <li>- PSA alterado: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 40-50 años <math>\geq</math> 3ng/ml</li> <li>- 51-70 años <math>\geq</math> 4ng/ml</li> <li>- &gt;71 años <math>\geq</math> 5ng/ml</li> <li>- 40-50 años con antecedentes familiares de CP: <math>\geq</math> 2'5ng/ml y VPSA &gt;0'75 año</li> </ul> </li> <li>- Anatomía patológica previa con: <ul style="list-style-type: none"> <li>- ASAP: pequeños grupos glandulaatípicos que se han asociado hasta en un 50% de casos con cáncer de próstata</li> <li>- PINAG: Neoplasia intraepitelial de alto grado, precursora de cáncer prostático.</li> </ul> </li> </ul>		
Pacientes que hayan otorgado el consentimiento informado por escrito para participar en el estudio		

### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

	SI	NO
Pacientes que no cumplan los previos		
Comorbilidad asociada: determinada por escala a cuatro años de mortalidad.		

**IMPORTANTE:** para incluir a los pacientes en el estudio tienen que estar marcadas todas las casillas sombreadas. De lo contrario, el paciente no cumple alguna de las características necesarias y no podrá ser incluido en el estudio.

Polimorfismos en el gen de la calicreína humana 2 (KLK2) y el desarrollo de cáncer de próstata. Relación con la proteína glandular humana 2(hK2) y las formas libre, total y ligada del PSA. <b>CÓDIGO:</b>	Investigador: SILVIA GARCÍA BARRERAS. HOSPITAL SEVERO OCHOA
	Nº HISTORIA PACIENTE

## ANTECEDENTES PERSONALES Y CLÍNICOS

Estimado investigador, por favor, cumplimente las siguientes preguntas relacionadas con los antecedentes personales y clínicos del paciente a partir de su historia clínica.

PESO: Kg      TALLA: , metros      IMC:

HISTORIA FAMILIAR DE CÁNCER DE PRÓSTATA:      SI       NO

ÉTNIA:

- Negra
- Latinos
- Europeos

PRESENCIA DE SÍNTOMAS DEL TRACTO URINARIO:      SI       NO

COMORBILIDADES:

HTA      SI       NO

DM:      SI       NO

DISFUNCIÓN ERECTIL:      SI       NO

CONSUMO ABUNDANTE DE GRASAS:      SI       NO

Nº BIOPSIA:

\*\*\* OBSERVACIONES:



## **ANEXO 3**



## **COMUNICACIONES A CONGRESOS**

1. Comparación de la eficacia del PSA total, complex e índice PSA libre /total medidos con dos métodos analíticos diferentes. García Barreras, S; Herrero Payo, A; García Lacalle, C\*; Téllez, M; Fiter Gómez, L; Lermo, J; Ramírez, J. Departamento de Urología; \*Análisis Clínicos -Hospital Universitario Severo Ochoa, Madrid. Congreso Nacional de Urología, Granada 2013.
2. Importancia del uso de dos métodos de análisis diferentes para medir PSA total, PSA complex e índice libre/total, y comparación de su eficacia para el diagnóstico de cáncer de próstata. García Barreras, S; J Herrero Payo; A Lermo, J; Ramírez, A; Borrego, J; García Lacalle, C\*; Téllez, M; Fiter Gómez, L. Departamento de Urología; \*Análisis Clínicos -Hospital Universitario Severo Ochoa, Madrid. Reunión nacional del grupo de Urooncología, A Coruña 2014.