

**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

**«Carcinoma de próstata: comparación de  
parámetros pronósticos tradicionales.  
Resultados de análisis del ADN por  
citometría de flujo y expresión  
inmunohistoquímica de la proteína p53»**

**Autor: José Manuel Abreu Falcón**  
**Directores: Dr. D. David Castro Díaz**  
**Dr. D. Hugo Alvarez-Argüelles Cabrera**  
**Dr. D. Lucio Díaz-Flores Feo**

**Departamento de Cirugía, Oftalmología y Otorrinología**

A mis padres

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por haber estado siempre a mi lado apoyándome en los buenos y malos momentos, depositando en mí toda su ilusión y confianza. Sin su ayuda y sacrificio ni esta Tesis Doctoral, ni mi carrera profesional, hubieran sido posibles. Gracias por fomentar en nosotros el afán de superarnos, de saber y por proporcionarnos una buena educación, es el mejor legado que podíais hacernos.

A mis hermanos por su incansable presencia, su constante apoyo y estímulo.

Al Dr. D. David Manuel Castro Díaz, por haberme introducido en el campo de la investigación y saber transmitirme su ilusión y su capacidad de trabajo, así como por su dirección en el mismo. Sin su dedicación y entrega no habría sido posible concluir esta Tesis Doctoral.

Al Dr. D. Hugo Alvarez Arguelles, por su dedicación en la meticulosa realización del trabajo microscópico, por ofrecerme generosamente toda su experiencia así como por su continua confianza y estímulo.

Al Dr. D. Lucio Díaz-Flores Feo, al que quiero expresar mi mayor admiración por su espíritu científico y por sus profundos conocimientos. Un sincero agradecimiento por su constante apoyo, enseñanzas y disponibilidad.

A los Dres. Manuel Barrera y Carlos Vilar Davi por su ayuda en el trabajo gráfico.

A D. José Manuel Gil Figueira por su incondicional apoyo en el tratamiento informático y gráfico.

A D. Antonio Pérez López por su interés y ayuda desde mis primeros pasos en el campo de la medicina.

A las señoritas Magdalena y Milagros, enfermeras del Servicio de Urología, Unidad de Urodinámica, por su desinteresada colaboración.

A Dña Pilar Pérez Molina, por su desinteresada ayuda en las preparaciones de las muestras.

Por último a todos los enfermos, verdaderos protagonistas y destinatarios de las investigaciones biomédicas.



# Índice

	Página
<b>Introducción</b>	
<b>Epidemiología</b>	<b>2</b>
<b>Factores pronóstico en el cáncer de próstata</b>	<b>7</b>
Factores pronóstico de tipo clínico y bioquímico	<b>10</b>
Raza	<b>10</b>
Edad	<b>11</b>
Tamaño tumoral	<b>12</b>
Hemoglobina, Hematocrito, Velocidad de Sedimento Globular	<b>15</b>
Fosfatasa ácida prostática	<b>16</b>
PSA	<b>18</b>
Metástasis	<b>21</b>
Parámetros pronóstico de microscopia óptica convencional en el carcinoma prostática	<b>23</b>
Tipo histológico	<b>23</b>
Márgenes de resección positivos	<b>24</b>
Grado de diferenciación	<b>25</b>
Características nucleares	<b>29</b>
Infiltración capsular	<b>29</b>
Extensión a vesículas seminales	<b>32</b>
Invasión perineural	<b>33</b>
<b>Estadio</b>	<b>33</b>
<b>Análisis del ADN en tumores</b>	<b>36</b>
Ciclo celular	<b>36</b>
Contenido en ADN y fracción de proliferación tumoral (Fase S)	<b>38</b>
<b>Otros estudios patológicos especiales</b>	<b>48</b>
<b>Otros factores pronósticos en investigación</b>	<b>51</b>
<b>Objetivos</b>	<b>56</b>
<b>Pacientes y Método</b>	<b>58</b>
<b>Métodos de estudio</b>	<b>64</b>
Método de estudio clínico	<b>64</b>
Método de estudio anatómico-patológico	<b>65</b>

Método de análisis estadístico de los datos	<b>85</b>
<b>Resultados</b>	<b>87</b>
Descripción de resultados	<b>88</b>
Descripción de resultados del estudio de comparación de variables	<b>92</b>
<b>Discusión</b>	<b>129</b>
Hallazgos clínicos y bioquímicos con significado pronóstico en el carcinoma prostático	<b>131</b>
Hallazgos patológicos con significado pronóstico en el carcinoma prostático	<b>136</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>167</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>171</b>

## 1.-INTRODUCCIÓN

## 1.1.- EPIDEMIOLOGÍA

La patología tumoral maligna constituye la segunda causa de muerte en nuestro país tras las enfermedades cardiovasculares, representando el 23% de todas las muertes<sup>9</sup>.

En España, al igual que en los países occidentales y económicamente desarrollados, la mortalidad por cáncer muestra una tendencia claramente ascendente, lo que obedece tanto a un aumento real de las tasas de incidencia como a una mejoría en el diagnóstico y notificación.

En la Comunidad Autónoma de Canarias, el cáncer ocupa uno de los primeros lugares dentro de los problemas sanitarios representando el 21.7% de las causas globales de muerte<sup>9</sup>.

Dentro de los tumores, uno de los más importantes en el varón, por su frecuencia y mortalidad, es el cáncer de próstata. En los últimos años, los numerosos estudios de investigación realizados han aportado nuevos conocimientos relacionados con este tumor. Sin embargo, aún existe gran controversia respecto a su comportamiento y abordaje terapéutico.

El hallazgo de carcinoma de próstata oculto, pequeño y bien diferenciado es bastante frecuente en toda la población masculina cuando son realizados estudios de necropsia. Tales carcinomas de próstata de pequeño volumen y bien diferenciados no son, en principio, causa importante de morbilidad o mortalidad.

El cáncer de próstata es una enfermedad clínica y la mortalidad por su causa varía a lo largo del mundo y dentro de los diferentes países, particularmente entre diferentes grupos étnicos o raciales. Desde el punto de vista de los estudios

epidemiológicos, el enfoque más importante es identificar si algunos rasgos genéticos, sociales, de comportamiento o dietéticos se relacionan con el cáncer de próstata focal bien diferenciado, el cual no es clínicamente importante, y porque en una pequeña fracción de individuos la evolución es rápidamente desfavorable, llevando a la muerte en un periodo de tiempo relativamente corto. Estudios genéticos recientes han conseguido identificar subclases genotípicas/fenotípicas del cáncer de próstata de crucial interés para los epidemiólogos<sup>256</sup>.

La valoración de la incidencia real del cáncer de próstata plantea problemas, en razón de su comportamiento biológico, por la frecuente aparición de cáncer latente no siempre diagnosticado.

De acuerdo con la literatura sabemos que el cáncer de próstata es la neoplasia maligna más frecuente en varones tanto en USA como en la CEE representando el 20 y el 13% respectivamente de los cánceres diagnosticados en este sexo<sup>175</sup>.

En nuestro entorno, es la segunda causa de muerte por cáncer después de las neoplasias broncopulmonares y se observa un aumento exponencial de mortalidad por su causa a partir de los 64 años<sup>175</sup>.

Aunque se han realizado numerosos estudios epidemiológicos para identificar su etiología, los resultados han sido, hasta ahora, inconclusos permaneciendo aún oscura la causa de esta neoplasia.

Se ha señalado la posible influencia de diversos factores de riesgo, siendo algunos de ellos objeto de discusión. Dentro de estos factores se refieren los siguientes:

▪ La Edad

Es un tumor muy raro antes de los 50 años, pero su frecuencia aumenta con la edad, hasta el punto de que el 85% de los casos son diagnosticados por encima de los 65 años<sup>407</sup>. El 80% de los varones con más de 90 años presentan carcinoma de la próstata<sup>175</sup>, y según algunos autores, el 100% lo desarrollarían si vivieran lo suficiente<sup>153</sup>.

▪ Factores geográficos y raza

Se ha descrito una incidencia superior en los países occidentales, especialmente en USA, y una baja incidencia en países orientales<sup>175</sup>. Sin embargo, parece ser que la frecuencia de carcinomas incidentales es igual para ambas poblaciones y que los japoneses que emigran a USA presentan una incidencia de cáncer clínico<sup>407</sup> igual a la de los oriundos de este país. Por lo tanto, podría pensarse que los factores medioambientales jugarían un papel fundamental.

En lo que se refiere a la raza, en USA, la mortalidad por este tumor, es dos o tres veces superior en varones de color que en la raza blanca para una misma área geográfica, estado socioeconómico y edad. No obstante, se ha demostrado una frecuencia de cáncer prostático incidental similar en ambas razas. Se ha sugerido que la probabilidad de detección del carcinoma incidental es igual en ambos grupos, pero en la raza negra, otros factores, probablemente genéticos, causarían desdiferenciación y crecimiento tumoral más rápido<sup>407</sup>.

▪ **Factores genéticos y heredo-familiares**

El cáncer prostático es significativamente más frecuente en pacientes con historia familiar de dicha neoplasia, con un riesgo 2.5 veces superior al de la población general<sup>358, 405, 414</sup>.

Desde el punto de vista genético, algunos autores han postulado la hipótesis de que genes reguladores pueden sufrir pérdida o deleciones que bloquean su labor de control sobre las mutaciones<sup>175</sup>.

Se ha descrito, por otro lado, un riesgo aumentado de cáncer prostático entre los varones con un grupo sanguíneo A<sup>175</sup>.

▪ **Factores hormonales**

Algunos datos apoyan la hipótesis de una posible influencia hormonal en la génesis del carcinoma prostático<sup>358</sup>. Entre estos es importante citar la respuesta de esta neoplasia al tratamiento hormonal, la posibilidad de inducir cáncer experimental mediante hormonas, la presencia de receptores esteroideos en células tumorales y la existencia de niveles intratumorales de testosterona/dihidrotestosterona muy superiores a los de la glándula prostática normal.

Sin embargo, no se ha logrado demostrar la relación entre trastornos hormonales y aparición de la enfermedad<sup>175</sup>.

▪ Factores medioambientales

No existe relación comprobada entre la ingesta de alcohol, el tabaco y el cáncer de próstata aunque ha sido referido mayor número de carcinomas incidentales A1 entre los fumadores <sup>175</sup>.

Es probable que los factores dietéticos influyan en la aparición y desarrollo del cáncer de próstata, pero la complejidad del estudio epidemiológico no ha permitido demostrarlo. Se piensa que la dieta rica en grasas saturadas puede ser un factor de riesgo, y que las grasas insaturadas así como las vitaminas A y C tienen un papel protector <sup>175</sup>.

En determinadas regiones, se ha considerado la exposición al óxido de cadmio como un factor de riesgo, sin embargo esta hipótesis no ha sido demostrada <sup>166, 358</sup>.

No son valorables como determinantes etiológicos ni la religión ni la clase social <sup>92, 175</sup>.

Tampoco se han encontrado diferencias significativas en la incidencia del cáncer de próstata entre casados, viudos, divorciados y célibes. Asimismo, no se ha objetivado relación entre fertilidad, eyaculación, masturbación o ritmo de coitos y la incidencia de cáncer de próstata. No obstante, es preciso señalar que la valoración de estos datos está siempre expuesta a multitud de sesgos. <sup>175, 320</sup>

No se ha demostrado el papel de agentes víricos o de enfermedades de transmisión sexual en la etiología de esta tumoración <sup>175</sup>.

Algunos estudios que incluyen a la vasectomía como factor de riesgo, parecen carecer de validez científica. <sup>100, 177</sup>

## 1.2.- FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

Para identificar los factores pronósticos es importante comprender la historia natural de la enfermedad y analizar los factores que influyen en su progresión. Como hay diferencias importantes en la eficacia del tratamiento en pacientes con carcinoma de la próstata, el tratamiento debe ser seleccionado según el pronóstico individual de cada individuo; para ello es fundamental estratificar los diferentes factores que influyen en el mismo<sup>103</sup>. Sin embargo, los parámetros pronósticos clínicos existentes no se relacionan adecuadamente con el seguimiento de la enfermedad, por lo que son necesarios nuevos factores que puedan predecir la progresión y supervivencia en el momento del diagnóstico.

Varios hallazgos clínicos, bioquímicos y patológicos han sido utilizados para predecir el pronóstico de pacientes con carcinoma de próstata. Entre estas variables podemos destacar el estadio clínico y patológico, el grado histológico, la morfología nuclear y nucleolar, el volumen tumoral, los receptores de hormonas esteroideas, y los niveles de fosfatasa ácida y alcalina<sup>182,315,430</sup>. Estos factores pueden constituir una fuente valiosa de información para estimar la calidad de vida así como el pronóstico. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha demostrado consistentemente la utilidad de estas variables<sup>307,315</sup>.

Como se sabe multitud de estudios nos han intentado definir una variedad de factores pronósticos, dependientes tanto del huésped como de las características del tumor.

De una forma sucinta los factores pronósticos se pueden agrupar en:

### 1) Características del Huésped

Las principales son la raza y la edad, aunque ninguna de las dos parecen determinar de forma concluyente el pronóstico, desvinculadas de otros muchos factores medioambientales y geográficos<sup>175</sup>.

### 2) Extensión del Tumor

El volumen del tumor en el momento del diagnóstico es uno de los factores pronósticos más determinantes<sup>175, 274</sup>.

La localización y multifocalidad, con posibilidades de invasión de las vesículas seminales, invasión perineural y/o capsular son hallazgos de mal pronóstico<sup>120,274</sup>. La invasión de estas estructuras está correlacionada con la aparición de metástasis linfáticas y óseas lo que ensombrece significativamente el pronóstico<sup>274</sup>.

### 3) Arquitectura Tumoral

La variedad histológica dentro de los adenocarcinomas determina su agresividad así como su posible hormonodependencia<sup>175</sup>.

El grado de diferenciación celular y arquitectural expresado por Gleason es otro de los factores pronósticos fundamentales del cáncer de próstata<sup>4,6,218</sup>.

#### 4) Citología Tumoral

Algunos estudios tratan de complementar el criterio del Patólogo, con una estimación computarizada de la redondez nuclear, empleándola como método pronóstico de alta fiabilidad <sup>104,132,218</sup>.

La ploidía tumoral es en la actualidad una línea de investigación primordial. Existen varios estudios que prueban que los pacientes con tumores de cariotipo diploide o tetraploide tienen favorable pronóstico, y buena respuesta a la supresión androgénica. Por el contrario, los pacientes con tumores de cariotipo triploide tienen un peor pronóstico <sup>232,256,407,432</sup>.

Las características del núcleo y del nucléolo, así como sus grados son elementos diferenciadores <sup>236,407</sup>.

Todos estos parámetros parecen tener correlación con las cifras de fosfatasa ácida prostática, de PSA y con su evolución <sup>60, 411</sup>.

#### 5) Biología Tumoral

Este grupo de características, muy relacionado con las anteriores, es un poco su consecuencia.

Los estudios de biología tumoral pueden ser realizados mediante cultivo celular. De su análisis podemos obtener información sobre factores de crecimiento, expresión oncogénica del tumor y la respuesta inmune del huésped.

Como ejemplo, del análisis de los receptores y marcadores podremos obtener su sensibilidad androgénica y la posible respuesta a la hormonoterapia.

## 6) Respuesta al Tratamiento

El estudio de los factores que ya han sido referidos puede darnos una aproximación de la respuesta al tratamiento, pero sólo la comprobación objetiva e individual en cada paciente nos describirá su verdadera hormonodependencia.

El cese de la respuesta al tratamiento del bloqueo androgénico completo, es un índice de mal pronóstico <sup>175</sup>, y se corresponde, en numerosos casos, con una fase de progresión tumoral acelerada.

### 1.2.1.-FACTORES PRONÓSTICOS DE TIPO CLÍNICO Y BIOQUÍMICO

#### 1.2.1.1.- Raza

La raza negra está asociada a un riesgo aumentado de mortalidad por cáncer de próstata, observación que se relaciona con estadios avanzados de presentación de esta neoplasia en esta raza <sup>247,286</sup>.

Factores no específicos de la enfermedad, tales como estado socioeconómico, asistencia a los centros de atención y otros comportamientos de salud, pueden particularmente explicar la alta mortalidad observada en la raza negra <sup>91</sup>. También se ha referido, recientemente, que dentro de un estadio clínico determinado, la raza negra se asocia con tumores de mayor volumen, lo cual puede ser una hipotética explicación para el aumento de mortalidad en esta raza <sup>306</sup>.

### 1.2.1.2.-Edad

La tasa de incidencia edad-específica para el cáncer de próstata ha aumentado en los últimos años en todo el mundo occidental<sup>171</sup>.

La incidencia aumenta en hombres a partir de los cuarenta años (1-2 por 100.000 y por año) hasta un pico a los ochenta (1.200 por 100.000 para caucásianos y 1.600 por 100.000 para afro-americanos)<sup>171</sup>.

La edad del paciente, en el momento del diagnóstico, está en relación con la mortalidad cáncer-específica; el riesgo, cuando el cáncer de próstata se diagnostica antes de los 60 años es tan elevado como del 80 %<sup>1</sup>. Por lo tanto, los pacientes jóvenes con una esperanza de vida de más de 15 años es de esperar que se beneficien de cirugía radical<sup>1</sup>. Por otro lado, el tratamiento conservador es una opción válida para pacientes por encima de los 70 años con cánceres de bajo grado, clínicamente localizados en la próstata y con una esperanza de vida menor de 10 años<sup>1</sup>.

La incidencia de cáncer prostático incidental es de aproximadamente 20 % en la séptima década. En este rango de edad es controvertido considerar un tratamiento agresivo<sup>218</sup>.

En algunos estudios en los que se ha analizado el resultado de la radioterapia en pacientes con carcinoma de próstata<sup>17,472</sup>, también se señala un peor comportamiento tumoral en pacientes más jóvenes.

En el estudio de Aus G. y cols.<sup>17</sup> en el que se analiza la supervivencia de pacientes con tratamiento no curativo (vigilancia o tratamiento hormonal), la tasa de

mortalidad por cáncer de próstata disminuyó con relación inversa a la edad en el momento del diagnóstico, si bien sólo para pacientes con edad superior a 75 años.

Por el contrario, estudios como el de Krongrad y cols.<sup>247</sup> sugieren que la biología tumoral y la respuesta al tratamiento empeoran con la edad. Que tengamos conocimiento, éste es uno de los pocos estudios de cáncer de próstata que demuestra un incremento del riesgo de mortalidad enfermedad-específica con la edad. Esta observación sugiere que la biología tumoral se modifica con la edad y que el cáncer de próstata en pacientes de edad avanzada es más agresivo que en pacientes jóvenes lo que contradice la opinión convencional<sup>247</sup>.

### 1.2.1.3.-Tamaño Tumoral

El volumen tumoral es reconocido como importante predictor pronóstico en otros órganos o sistemas; sin embargo, es un parámetro mucho más difícil de medir en el caso del carcinoma prostático que en otros tumores<sup>120,373</sup>, debido a varios factores. Entre estos factores se destaca la dificultad para delimitar un margen claro de los tejidos sanos circundantes; incluso cuando visible macroscópicamente, el tumor es consistentemente infraestimado al compararlo con el examen microscópico<sup>120</sup>. Por otro lado, suelen asumir una multiplicidad de formas irregulares, no concordantes con formas geométricas medibles, por lo que los estudios basados en la medición de ejes anteroposterior, transversal y craneocaudal no se correlacionan bien con el volumen verdadero<sup>120</sup>. Otro aspecto a tener en cuenta es la tendencia a la multifocalidad de esta neoplasia<sup>82</sup>.

Clásicamente se admite que el volumen del cáncer de próstata es expresión de su agresividad biológica y que su aumento se relaciona con mayor número de áreas con altos grados de indiferenciación así como un mayor riesgo de extensión local y de diseminación<sup>274</sup>.

La hipótesis de que la progresión tumoral está en relación con el volumen se basa en que dicha progresión, por lo general, se relaciona estrechamente con la división celular acumulativa (Goldie, Cohen y Ellwein)<sup>407</sup>. Esta relación proporciona las bases conceptuales para una ligación directa entre volumen de cáncer y probabilidad de metástasis<sup>407</sup>.

La determinación del volumen de riesgo es difícilmente realizable en pacientes individuales dada la posible interferencia de otros factores con significado pronóstico. Los tumores pequeños pueden tener un comportamiento biológico agresivo, si bien en la mayoría de los casos existe una correlación adecuada entre aumento de volumen y agresividad<sup>291</sup>.

Epstein y cols.<sup>120</sup> consideran que el volumen del cáncer por sí mismo es de valor pronóstico en cuanto a la progresión, si bien estiman que una vez conocido el grado de Gleason y la situación de los márgenes quirúrgicos, más fáciles de determinar, no se justifica el estudio de toda la pieza para obtener la información adicional que puede aportar el volumen.

La relación entre el volumen y el grado histológico de Gleason es controvertida según algunos autores<sup>290</sup>.

Según Miller y Cygan<sup>291</sup> el carcinoma prostático no necesita alcanzar volúmenes grandes para ser mal diferenciado. Así, aunque se encuentra una ligera relación entre volumen tumoral y grado, existe una notable superposición en cuanto a la distribución de volúmenes entre los diferentes grados, con tumores con grados entre 2 y 10, y volúmenes inferiores a 1cc., aunque obviamente predominen tumores con bajo grado en este volumen. Lo mismo ocurre con tumores mayores de 10 cc. entre los que encuentra grados de 4 a 9.

McNeal <sup>274</sup> ,por el contrario, afirma que la agresividad biológica del adenocarcinoma de próstata está directamente en función del volumen del tumor realzando, de esta forma, la importancia del volumen tumoral como indicador pronóstico en el cáncer de próstata.

El volumen tumoral se correlaciona fuertemente con otros predictores de agresividad biológica , tales como el estadio patológico, incluyendo penetración capsular, invasión de vesículas seminales y metástasis ganglionares linfáticas <sup>120,274</sup> , así como con el grado de Gleason <sup>120,274,290</sup> y la ploidía del ADN <sup>134</sup> .

Parece ser que los tumores prostáticos cuando exceden de cierto tamaño tienden a ser biológicamente más agresivos y tener un mayor contenido de ADN no diploide<sup>194</sup> . Según los trabajos de Häggman y cols.<sup>194</sup> el contenido de ADN no diploide en las células del carcinoma prostático es un fuerte predictor del tamaño tumoral y de la penetración capsular y , por lo tanto, posiblemente, de la agresividad biológica.. De esta forma, la medición pre-operatoria de la ploidía del ADN puede ser un importante campo de información sobre la malignidad y estadio del carcinoma de la próstata y consecuentemente una importante ayuda para caracterizar las propiedades del tumor <sup>194</sup> .

No existe acuerdo sobre qué volumen tumoral debería ser considerado clínicamente significativo. Para algunos autores, como Palken y Stamey, el volumen tumoral de 3 cc representa el límite para definir la severidad de la enfermedad. En uno de sus trabajos <sup>332</sup> ,Palken destaca que de los pacientes con volumen tumoral superior a 3 cc, 59 % estaban en estadio C o D; todos los tumores en estadio B tenían un volumen inferior a 3 cc. Stamey y cols.<sup>408</sup> afirman que solamente el 18 % de tumores con volumen menor de 3 cc penetran a través de la cápsula prostática opuestamente al 79 % de aquellos con volumen superior a los 3 cc.

Respecto al tacto rectal, aunque su sensibilidad es elevada, cuando es realizado por personal experimentado <sup>250</sup>, las definiciones de "focal" y "difuso" así como de "pequeño" y "grande" son potencialmente difíciles de reproducir consistentemente en la práctica clínica <sup>218</sup>.

Como método para detección de recidivas locales el tacto rectal tiene bastantes limitaciones, tanto por su carácter de exploración muy subjetiva como por las alteraciones de tipo fibrosis originadas por la propia cirugía <sup>373</sup>.

Pedersen y cols. <sup>345</sup> refieren que el examen rectal digital cuidadoso es un buen método costo-eficacia para el diagnóstico precoz del cáncer de próstata, pero es incapaz de aportarnos datos sobre el pronóstico.

#### 1.2.1.4.-Hemoglobina, Hematocrito, Velocidad de Sedimentación Globular (VSG)

Encontrar marcadores séricos para determinar la presencia y extensión de la enfermedad maligna, su progresión en el tiempo así como el éxito o no del tratamiento han sido objetivos importantes de investigación en el carcinoma de cualquier órgano.

La importancia pronóstica de las cifras de hemoglobina, de la velocidad de sedimentación eritrocitaria y de la fosfatasa alcalina ha sido confirmada <sup>103,232</sup>.

La Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer, analizando los estudios de De Voogt y cols. <sup>103</sup>, ha realzado la importancia pronóstica de estos factores así como el valor pronóstico del estado funcional y el dolor.

#### 1.2.1.5.-Fosfatasa Alcalina

Aunque es un marcador relativamente inespecífico , la elevación de la fosfatasa alcalina está normalmente asociada con metástasis óseas en pacientes con cáncer de próstata <sup>400</sup>. Las variaciones en los niveles de fosfatasa alcalina pueden ser, por tanto, indicativas de curación de metástasis óseas o de progresión de la enfermedad <sup>400</sup>.

La fosfatasa alcalina es un fuerte factor pronóstico independiente siendo para algunos autores<sup>262</sup> un predictor más fuerte de supervivencia después del tratamiento hormonal que la fosfatasa ácida prostática.

En el trabajo de Smith y cols.<sup>400</sup> en el que se estudia el valor pronóstico de marcadores séricos antes del inicio del tratamiento hormonal o precozmente en el curso del tratamiento, los niveles de fosfatasa alcalina superiores a dos veces el valor normal antes del tratamiento, están en relación con pacientes con alta probabilidad de tener una respuesta de duración corta.

Se ha referido que los pacientes con niveles de fosfatasa alcalina de dos o más veces los valores normales, tienen aproximadamente una supervivencia dos veces inferior que los sujetos con cifras normales para este parámetro <sup>400</sup>.

#### 1.2.1.6.-Fosfatasa Ácida Prostática

El carcinoma de próstata fue el primer tumor maligno para el cual la evaluación bioquímica de un marcador sérico con sentido pronóstico se hizo posible mediante los tests de fosfatasa ácida sérica (Gutman y Gutman , 1938) <sup>407</sup>.

Tres años después de que estos autores demostraran que los títulos de fosfatasa ácida sérica estaban elevados en un grupo de pacientes con cáncer

prostático metastásico, Huggins y Hodges (1941)<sup>407</sup> verificaron su papel como medidor de la respuesta a orquiectomía bilateral o tratamiento estrogénico.

La fosfatasa ácida prostática (PAP) y el antígeno prostático específico (PSA) son dos proteínas prostáticas usadas principalmente como marcadores bioquímicos en suero de enfermedad residual y recurrencia del cáncer de próstata<sup>411</sup>.

Sin embargo, como las fosfatasas ácidas se encuentran en otros órganos y tejidos además de la próstata, no es de sorprender que otros tumores puedan presentar elevación sérica de las fosfatasas ácidas enzimáticas<sup>407</sup>. Entre estos, el cáncer gástrico, el pancreático, el de pulmón, el de mama, el carcinoide rectal, la leucemia, el mieloma múltiple e incluso la enfermedad de Paget también pueden cursar con elevación de esta enzima<sup>407</sup>.

En los trabajos de Stege y cols.<sup>411</sup> se confirma que el aumento de malignidad en el grado citológico se sigue de una disminución del contenido celular de PAP en el tejido prostático. Por el contrario, los estudios serológicos de la PAP no han mostrado ninguna correlación con el grado de malignidad citológico o histológico<sup>131,199</sup>.

La PAP y el PSA en tejido prostático son marcadores bien correlacionados con el grado citológico, estadio, con los hallazgos de citometría de flujo<sup>411</sup> y con la presencia de metástasis<sup>472</sup>.

Se ha señalado<sup>62</sup> que el significado pronóstico de los niveles de fosfatasa ácida prostática está mediado completamente por su correlación con el grado patológico. Aunque se ha referido que esta correlación entre grado y niveles de fosfatasa ácida prostática altera por completo el significado independiente de niveles elevados de fosfatasa ácida prostática<sup>392</sup>, en el estudio de Zagars y cols. se demuestra el significado pronóstico de la fosfatasa ácida prostática cuando es usada como variable independiente<sup>60,472</sup>.

La cuestión de si la elevación sérica de la fosfatasa ácida enzimática siempre indica cáncer metastásico es controvertida<sup>407</sup>. Por una parte, los métodos de medida no tienen la misma sensibilidad y por otra, no existe consenso respecto a qué niveles pueden ser considerados elevados (1%, 5% ó 20%)<sup>407</sup>. Además, probablemente el PSA también se encuentra elevado en todos estos casos por lo que la misma información se podría obtener de la determinación de los niveles de este último<sup>407</sup>.

#### 1.2.1.7.-PSA

El PSA fue primariamente identificado e informado por Wang y cols. en 1979. Esta glicoproteína es una proteasa sérica de 34.000 daltons de peso molecular y es específica del tejido epitelial prostático<sup>381</sup>. Los niveles de fosfatasa ácida sérica, ya sean medidos por métodos enzimáticos ya sean por radioinmunoanálisis, no son casi nunca, tan sensitivos como los niveles de PSA para un estadio clínico determinado<sup>407</sup>.

En 1991, el PSA era el único marcador cancerígeno órgano-específico con la posible excepción de la tiroglobulina<sup>400</sup>.

Varias publicaciones de Roswell Park, entre 1980 y 1986, confirmaron que el PSA es órgano-específico y que las elevaciones del mismo pueden ocurrir tanto en cáncer como en hiperplasia prostática benigna; también que el PSA es un importante marcador pronóstico para monitorizar pacientes con cáncer de próstata<sup>407</sup>.

Sin embargo, hay que referir que las elevaciones del PSA por encima del rango normal no son necesariamente diagnósticas de cáncer de próstata. Hudson y cols.<sup>214</sup> refirieron que 2 % de los pacientes con hiperplasia benigna de la próstata

tenían niveles de PSA superiores a 10 ng/ml y que 44 % de pacientes con cáncer de próstata demostraron niveles de PSA por encima de 10 ng/ml.

La determinación del PSA y la ecografía transrectal se comenzaron a aplicar en la rutina clínica en 1988<sup>17</sup>.

Bernstein y cols.<sup>36</sup> indicaron que con valores de PSA menores de 11.3 ng/ml (método de Hybritech), la hiperplasia benigna de la próstata es, ampliamente, más probable que el cáncer de próstata. Si el PSA es menor de 3.5 ng/ml el cáncer de próstata es, efectivamente, raro. Cuando los niveles de PSA están entre 11.3 y 22.8 ng/ml el cáncer de próstata se encuentra en 39 % y la hiperplasia benigna en 61 %. Cuando los valores de PSA son superiores a 22.8 ng/ml son indicativos de cáncer de próstata con solamente pocas excepciones, por ejemplo hiperplasia benigna con infartos o prostatitis aguda. Estos autores no encontraron enfermedad benigna en pacientes con valores de PSA superiores a 54.6 ng/ml.

Algunos artículos<sup>407</sup> han revelado que los valores de PSA son efectivamente proporcionales al volumen del cáncer intraglandular y que después de la prostatectomía radical los niveles caen a 0 (< 0.3 g/ml) (Stamey y cols., 1987).

Los valores de PSA tienen valor clínico en la monitorización de pacientes con cáncer de la próstata que han sido sometidos a prostatectomía radical<sup>374,379</sup>, radioterapia<sup>157,360</sup> y/o tratamiento hormonal<sup>292,310</sup>.

Algunos datos han planteado la duda sobre si la elevación del PSA puede considerarse cáncer-específica tras la cirugía radical<sup>373</sup>. La demostración de la existencia de PSA en la orina sin correlación clara con recidiva o su ausencia<sup>224</sup>, hace sospechar su posible secreción por las glándulas parauretrales normales<sup>156</sup>, probablemente en cantidades poco importantes pero en algunos casos posible fuente de error. La retención de tejido prostático normal tras la cirugía puede ser también

causante de elevación en los niveles postoperatorios del PSA en algunos pacientes  
373 .

Como los valores séricos de PSA y la progresión del cancer de próstata son proporcionales al volumen tumoral puede pensarse que los niveles de PSA serían muy útiles como predictores preoperatorios del estadio patológico <sup>407</sup>. Sin embargo, varias investigaciones, utilizando métodos diferentes a la técnica policlonal de Yang, así como diferentes técnicas histológicas para examinar la próstata, no han encontrado que los niveles séricos preoperatorios de PSA sean muy útiles en la predicción del estadio patológico <sup>407</sup>.

Aunque es cierto que existe un cierto grado de correlación entre niveles de PSA y estadio clínico-patológico, la determinación de cifras concretas para establecer criterios individuales plantea problemas clínicos de difícil resolución. La superposición de valores entre los distintos estadios, así como la probable interferencia de otros factores, conlleva una gran falta de especificidad que hace imposible predecir el estadio patológico de forma individualizada basándose de modo exclusivo en los niveles de PSA, existiendo la posibilidad de afectación de vesículas seminales e incluso ganglionar con niveles de PSA bajos, mientras que valores altos pueden estar relacionados con estadios teóricamente curables con cirugía radical <sup>323</sup>.

La correlación PSA-volumen parece claramente establecida. No obstante, existen ciertas dificultades para establecer una relación similar entre PSA y grado histológico <sup>334</sup>.

Parece ser que a medida que se pierde diferenciación celular y aumenta el grado de Gleason disminuye la producción neta de PSA por las células cancerosas <sup>407</sup>. Sin embargo, en estas circunstancias, no es de sorprender que los niveles de PSA continúen aumentando en suero en proporción razonable al aumento de la carga tumoral en pacientes no tratados <sup>407</sup>.

Algunos trabajos <sup>239,241</sup> señalan que la precisión predictiva del PSA aumenta en adición con otros factores, incluyendo estadio clínico y score de Gleason.

#### 1.2.1.8.-Metástasis

La presencia o ausencia de metástasis a distancia es el factor pronóstico clínico más importante <sup>35</sup>.

Los pacientes con afectación microscópica regional de ganglios linfáticos alcanzan una larga supervivencia cuando estos son extirpados por cirugía y es asociada radioterapia<sup>21</sup>.

Sin embargo, aquellos con metástasis linfáticas y micrometástasis ósea usualmente presentan progresión de la enfermedad con reducción de la esperanza de vida a los 10 años <sup>244</sup>.

Algunos carcinomas son diagnosticados tardíamente cuando las metástasis a distancia ya están presentes ; estos pacientes tienen mal pronóstico con una media de supervivencia de aproximadamente dos años <sup>17</sup>.

En pacientes con carcinoma de próstata metastásico, el tratamiento hormonal, principalmente la deprivación androgénica , es el abordaje terapéutico principal. La mayoría de estos pacientes responden favorablemente a este tratamiento, sin embargo, la duración de la respuesta y la supervivencia es altamente variable<sup>400</sup>. Aproximadamente, 70 - 80 % de los pacientes con metástasis óseas muestran mejoría sintomática después de la institución del tratamiento hormonal<sup>248</sup>. Sin embargo, se encuentran datos bioquímicos de respuesta, como por ejemplo disminución de los niveles de PSA en más del 99% de los pacientes tratados <sup>399</sup>.

Los factores de rutina clínica (hemoglobina, VSG y fosfatasas alcalinas) tienen un importante impacto pronóstico por su relación con la existencia de lesiones óseas <sup>232,309</sup>.

El volumen tumoral también ha sido relacionado fuertemente con la existencia de metástasis <sup>407</sup>.

Stamey y cols. <sup>408</sup> correlacionaron el volumen tumoral con la existencia de metástasis linfática y encontraron que tumores con volúmenes superiores a 3 cc. tenían significativamente una elevada proporción de metástasis linfática.

Para otros autores el volumen tumoral, aunque es un importante parámetro predictor de afectación linfática en pacientes con carcinoma de próstata <sup>53</sup>, no refleja suficientemente la agresividad biológica de esta tumoración.

Para Villers y cols. los tres parámetros más desfavorables en el carcinoma de la próstata son: la presencia de metástasis microscópica, indetectable en los ganglios linfáticos pélvicos durante el tiempo quirúrgico; el volumen tumoral intraglandular superior a 12 ml. y ; la existencia de invasión de las vesículas seminales especialmente cuando ésta es extensa <sup>446</sup>.

La invasión microvascular de las vesículas seminales ha demostrado correlación positiva con la invasión capsular de la próstata, así como con la existencia de metástasis linfáticas, comportándose de este modo como un factor predictivo de progresión tumoral <sup>184</sup>. Sin embargo, hay autores que han observado una baja frecuencia de ganglios positivos en pacientes con invasión de las vesículas seminales <sup>446</sup>. Cuando la invasión de vesículas seminales es comparada con otros parámetros indicativos de metástasis linfáticas tales como el volumen y el grado histológico se comprueba que estos dos son predictores más fuertes <sup>446</sup>. Por lo tanto, de estos tres índices, la invasión de las vesículas seminales es el predictor más débil de

diseminación tumoral; esto es, si el volumen tumoral y el grado histológico son conocidos, la extensión a las vesículas seminales no incrementa el valor predictivo de estas variables <sup>446</sup>.

McNeal y cols. han señalado que la desdiferenciación se relaciona fuertemente con la existencia de metástasis <sup>407</sup> y que sólo los tumores con score de Gleason superior a 4 ó 5 presentan metástasis <sup>275</sup>.

Algunos estudios, como el de Berner y cols. <sup>35</sup> han señalado que la ploidía del ADN no es un factor predictor de metástasis linfáticas.

Respecto a la correlación PSA-metástasis se ha señalado que para pacientes recientemente diagnosticados, que no han sido tratados, que presentan concentraciones de PSA iguales o menores de 10 ng/ml y que no tienen síntomas de metástasis óseas, la diseminación ósea es improbable por lo que los estudios de extensión tumoral no parecen ser necesarios a la hora de tomar una decisión clínica y/o terapéutica <sup>366</sup>.

## 1.2.2.- PARÁMETROS PRONÓSTICOS DE MICROSCOPIA ÓPTICA CONVENCIONAL EN EL CARCINOMA PROSTÁTICO

### 1.2.2.1.-Tipo histológico

Además del tipo adenocarcinomatoso, otras variantes del carcinoma prostático pueden ser encontradas en la muestra de biopsia. Algunas de ellas conllevan un peor pronóstico.

Dentro de estos tipos histológicos con peor pronóstico se incluyen el carcinoma mucinoso <sup>125,362</sup>, el carcinoma indiferenciado de células pequeñas <sup>326</sup>, el

adenocarcinoma ductal prostático <sup>48,109</sup>, el adenocarcinoma en anillo de sello <sup>357,361</sup> y el carcinoma sarcomatoide <sup>389,464</sup>.

#### 1.2.2.2.- Márgenes de resección positivos

La demostración de márgenes positivos en la porción teñida de la pieza quirúrgica implica un elevado riesgo de enfermedad residual y por lo tanto de recidiva local de la neoplasia prostática. Sin embargo, esta correlación no es lineal para todos los casos ya que algunos tumores originan una reacción desmoplástica que favorece su separación del tejido adiposo periprostático y por tanto una exéresis completa <sup>457</sup>.

La localización de los márgenes positivos debe tenerse en cuenta a la hora de la valoración pronóstica, ya que puede tener diferente significado según la zona afectada. Así, algunos autores han señalado la importancia pronóstica que tiene la extensión apical del cáncer prostático, ya que el corto trayecto extraprostático de las ramas nerviosas que abordan el ápex en posterolateral y la proximidad de estructuras anatómicamente importantes en esa zona hacen mayor la probabilidad de márgenes positivos durante la disección <sup>447</sup>. De hecho, la zona del ápex es la más relacionada con márgenes positivos representando casi la mitad de estos en algunas series <sup>279</sup>.

Para Paulson <sup>340</sup>, la presencia de márgenes positivos tras cirugía radical por cáncer de próstata representa el factor de mayor riesgo vital, sobrepasando a todos los demás factores de riesgo, con una probabilidad de fallecer por el mismo de hasta un 60% en 13.5 años.

Zincke y cols. <sup>475</sup> refirieron una supervivencia a los 5 años de 60 % en pacientes con márgenes positivos.

Aunque varios parámetros - penetración capsular, márgenes quirúrgicos positivos, invasión de vesículas seminales y metástasis ganglionares - se han asociado tradicionalmente con mal pronóstico, la relación entre ellos no ha sido completamente esclarecida<sup>407</sup>. Sí se ha encontrado correlación de márgenes positivos con el tamaño tumoral<sup>229</sup>, con el estadio patológico<sup>118</sup>, con la elevación sérica del PSA postoperatorio<sup>216</sup> y con la supervivencia<sup>341</sup>.

### 1.2.2.3.- Grado de diferenciación

Como el carcinoma de próstata puede expresarse con variados patrones estructurales, un gran número de diferentes sistemas de gradación han sido propuestos (Brawn, 1982; Gaeta y cols., 1980; Gleason, 1977; Harada y cols., 1977; Mostofi, 1975; Utz y Farrow, 1969)<sup>54,162,180,198,302,407</sup>. La diversidad estructural de esta tumoración complica la gradación no sólo por los distintos patrones posibles, sino también porque es frecuente encontrar diferentes áreas dentro del mismo tumor, especialmente cuando estos son mayores de 1 cc.<sup>407</sup>.

La gradación sistémica más utilizada es la de Gleason que se basa puramente en criterios histológicos (Gleason, 1977)<sup>180</sup>. Esta clasificación que fue evaluada y desarrollada por el VACURG (Veteran Administration Cooperative Urological Research Group) en la década de 1960<sup>358, 179</sup>, ha sido ampliamente utilizada. En ella son considerados básicamente dos parámetros, el grado de diferenciación glandular y el patrón de crecimiento tumoral en el estroma prostático. El sistema de gradación establece cinco grados o patrones histológicos:

Patrón 1: glándulas uniformes, en masas circunscritas, bien diferenciadas, pequeñas y agrupadas;

Patrón 2: similar al 1, con moderada variación de tamaño y morfología glandular en masas circunscritas pero algo más desordenadas, con mayor atipia celular;

Patrón 3: similar al 2, con irregularidad marcada en tamaño y morfología de las glándulas presentando glándulas pequeñas o células individuales invadiendo el estroma;

Patrón 4: tumor de glándulas fusiformes, infiltrante, con frecuente hallazgo de células pálidas; y

Patrón 5: carcinoma anaplásico, con mínima diferenciación glandular, infiltrando difusamente el estroma.

De acuerdo con esta clasificación se asigna un grado primario al patrón que ocupa el área mayor de la muestra y, un grado secundario al patrón que predomina en segundo lugar.

Valores de 2 a 4 incluirán tumores bien diferenciados, de 5 a 7 moderadamente diferenciados y de 8 a 10 tumores indiferenciados.

Como algunos tumores incluyen tres o más tipos diferentes se han definido varios parámetros para facilitar el uso de esta clasificación:

- Omitir el grado menor si representa menos de 5 % del tumor;
- Si el grado mayor y menor representan más del 5%, no se considera el grado intermedio;
- Se omite el grado mayor si representa menos del 5%;
- Si el grado mayor es >5% y alguno de los otros es muy extenso, este grado predominante se considera primario y el de mayor grado secundario;
- Si el valor de los tres grados no es correlativo se utilizarán los dos más grandes.
- En muestras pequeñas se consideran los grados más altos.

La agresividad tumoral es superior en carcinomas moderadamente diferenciados que en los bien diferenciados <sup>4,6</sup>.

Algunos autores<sup>66,474</sup> comunican una supervivencia causa-específica a los 15 años de 93% para tumores con índice sumatorio de Gleason (ISG) inferior a 3, 82% para tumores con ISG de 4 - 6 y 71% para tumores con ISG igual o superior a 7.

Por otro lado, aunque el grado histológico del carcinoma incidental inicialmente no era considerado de riesgo biológico, se ha señalado que éste podría ser de importancia sustancial en la historia natural de esta tumoración<sup>218</sup>. En una revisión de 55 prostatectomías suprapúbicas en las que se encontró incidentalmente cáncer, la gradación de éste permitió encontrar diferencias importantes con relación a la supervivencia<sup>30</sup>. Así mientras los pacientes con carcinoma bien diferenciado presentaban una supervivencia a los 10 años del 47%, en los menos diferenciados fue del 14%.

La gradación histológica de Gleason es de importante valor pronóstico y está estrechamente relacionada con el volumen tumoral, la penetración capsular, la afectación de vesículas seminales, la existencia de metástasis ganglionares, el estadio clínico y patológico, y la supervivencia<sup>218</sup>.

El conocimiento adecuado del volumen tumoral y del grado histológico puede ser de importancia en la predicción del comportamiento biológico de esta tumoración<sup>280</sup>; sin embargo, ejemplos de bajo grado/gran volumen tumoral y grado elevado/volumen tumoral pequeño existen claramente<sup>290</sup>.

Un elemento aún de controversia es la capacidad del carcinoma prostático para desdiferenciarse a lo largo de su evolución, en un proceso que, en opinión de McNeal y cols.<sup>232,275,280</sup>, se iniciaría a partir de la mayoría de los carcinomas con grado intermedio, capaces de progresar a grados altos en una correlación directa con el aumento del volumen. Contrariamente, Miller y Cygan<sup>291</sup> no encuentran una correlación tan clara en cuanto al volumen tumoral y grado, señalando que el grado

histológico es una cualidad inherente al tumor desde su origen que no cambia con el tiempo.

Respecto a la afectación capsular, aunque la opinión global coincide en la existencia de una buena correlación entre grado histológico y penetración capsular, en algunas series esto no se verifica como ocurre en la de Miller y Cygan <sup>291</sup> en la que el 43,3% de los tumores con penetración capsular fueron de grado histológico bajo.

Pocos estudios han relacionado el grado histológico de Gleason en muestras de biopsia solamente con el pronóstico <sup>67,245,342</sup>. En las muestras de prostatectomía radical han sido bien establecidos como factores pronósticos tisulares: el grado histológico, los márgenes positivos, el estadio patológico y la extensión tumoral intraglandular (medida como volumen tumoral o como porcentaje de glándula afectada) <sup>218</sup>. Se señalan como factores de buen pronóstico las puntuaciones bajas en la gradación de Gleason, los estadios patológicos no avanzados, el volumen tumoral pequeño y la baja incidencia de márgenes positivos <sup>218</sup>.

El aumento del grado histológico en muestras de prostatectomía radical se relaciona con aumento de volumen tumoral <sup>280</sup>, aumento del estadio clínico y patológico <sup>152,335</sup>, incremento de la probabilidad de progresión futura <sup>217,219</sup> y de fracaso del tratamiento <sup>341</sup>.

La incidencia de márgenes positivos tras cirugía se ha estimado en el 36% para tumores con moderada diferenciación frente al 67% para tumores poco diferenciados <sup>115</sup>, considerándose el grado histológico alto como un factor predictivo importante de márgenes positivos <sup>88</sup>.

#### 1.2.2.4.- Características nucleares

El aumento nuclear es un hallazgo prácticamente universal en el adenocarcinoma de próstata<sup>407</sup>. Este aumento aparece invariablemente acompañado de hiper cromasia y de nucléolos aumentados y prominentes<sup>407</sup>.

En las células prostáticas benignas el tamaño nucleolar raramente está aumentado<sup>236,407</sup>. La presencia de nucléolos aumentados, prominentes y densamente teñidos es una característica frecuente de la mayoría de adenocarcinomas prostáticos.

Los sistemas de gradación basados en las características nucleares tendrían la ventaja de que estos hallazgos citológicos se mantienen relativamente constantes a través de las diferentes áreas del tumor<sup>407</sup>. Sin embargo, el problema de la distorsión nuclear en las muestras de biopsia es considerable y no han sido propuestas soluciones sustanciales.

El grado de desviación nuclear respecto a la normalidad se correlaciona con una menor diferenciación. Es probable que estos dos parámetros estén íntimamente relacionados, por lo que algunos autores no consideran necesario estimar las características nucleares con objetivos pronósticos<sup>407</sup>.

#### 1.2.2.5.- Infiltración capsular

La existencia de la cápsula prostática como unidad anatómica definida es un concepto muy discutible<sup>117</sup>. La cápsula prostática es una banda de tejido fibromuscular inseparable del estroma prostático, cuya porción más externa forma algunos haces de estroma fibromuscular que penetran en el tejido periprostático y desaparecen en él. En el ápex sus límites anatómicos son difíciles de definir porque desaparece su porción fibromuscular externa, los elementos glandulares se encuentran más

dispersos y los márgenes quirúrgicos están formados por un área mal definida en la que se mezcla fibras musculoescléticas, músculo liso y tejido fibroso <sup>16,364</sup>. Sus características de incompleta y de ser inseparable de la glándula, hace que la definición de cápsula no sea totalmente aceptable <sup>18,373</sup>.

La penetración capsular es un fenómeno muy común en los carcinomas de la zona de no transición <sup>270</sup>; sin embargo, en los de la zona de transición aparece con la mitad de frecuencia y tiende a ser menos extensa <sup>407</sup>.

La diseminación extracapsular a través de los espacios perineurales, sin infiltración verdadera de la cápsula, representa el 50 % de algunas series <sup>373</sup>. Este hecho puede explicar porqué algunos tumores con baja capacidad biológica son capaces de hacerse extracapsulares aprovechando esas vías de menor resistencia representadas por los nervios que penetran en la cápsula, fundamentalmente a nivel apical y posterior <sup>373</sup>.

En un elevado porcentaje de casos la extensión tumoral combina estas dos formas de diseminación, esto es, la infiltración capsular y la invasión siguiendo los espacios perineurales <sup>373</sup>.

No se sabe, por el momento, si estos tres tipos de diseminación extraprostática ( perineural aislada, infiltrante aislada y mixta ) representan diferentes neoplasias y tienen alguna traducción pronóstica, y sobre todo si pueden diferenciarse con carácter preoperatorio, pero, tal vez, podrían explicar las discrepancias en la evolución de pacientes entre las diversas series <sup>274</sup>.

La relación entre pronóstico oncológico y afectación de la cápsula prostática parece ser admitida, si bien la estrecha correlación con otros factores de riesgo para la extensión y progresión del tumor como el volumen tumoral y el grado histológico dificultan la interpretación de su impacto como factor pronóstico aislado

<sup>123</sup>. Se le ha atribuido un valor complementario en el estudio del riesgo de progresión en los casos de volúmenes tumorales intermedios, con mayores dificultades de interpretación <sup>123,373</sup>.

Cheng y cols., en un estudio de 1035 pacientes, no encontraron relación de la progresión tumoral y supervivencia con la perforación capsular, pero sí observaron que ésta, sí se relacionaba con el grado y volumen del tumor<sup>80</sup>. La asociación entre grado de Gleason alto y perforación capsular ha sido también confirmada por otros autores <sup>88</sup>.

Sin embargo, hay autores<sup>235</sup> que opinan que la penetración capsular establecida es por sí misma signo de enfermedad diseminada y predice la progresión posterior de la neoplasia, cuestionando incluso la indicación de cirugía radical en los estadios C en los que la probabilidad de afectación capsular establecida es elevada <sup>373</sup>.

Las evidencias actuales indican que solamente la completa penetración de la cápsula prostática con perforación de su superficie externa se correlaciona con el pronóstico y con otros parámetros de agresividad (Byar y cols. 1972; McNeal y cols., 1986; 1990; Stamey y cols., 1988) <sup>61,275,280,406</sup>. La invasión de la cápsula sin penetración no es considerada factor pronóstico significativo <sup>61</sup>. También la penetración completa de la cápsula cuando está limitada a una pequeña área (menor o igual de 0.5 cm<sup>2</sup>) de la superficie, parece no tener significado pronóstico adverso <sup>407</sup>.

La probabilidad de estar libre de enfermedad a 10 años de la prostatectomía radical se ha estimado en 85% para pacientes con enfermedad confinada a la glándula, 82% con afectación focal de la cápsula y 54 - 42% con afectación capsular establecida, según el grado histológico de diferenciación <sup>457</sup>, cifra similar a la estimada para aquellos pacientes con infiltración de vesículas seminales <sup>373</sup>.

La extensión de la penetración capsular, el volumen tumoral, la positividad de ganglios linfáticos y la invasión de las vesículas seminales están estrechamente relacionados entre sí <sup>279</sup>.

En la opinión de algunos autores, la infiltración microscópica de la cápsula así como de un ganglio linfático unilateral no tiene significado en la evolución de estos pacientes <sup>208</sup>.

#### 1.2.2.6.- Extensión a vesículas seminales

La invasión de la vesícula seminal ha sido tradicionalmente referida como un índice de mal pronóstico (Jewett y cols., 1972) <sup>226</sup>. Sin embargo, su estrecha relación con otros parámetros de progresión no permite asegurar su papel pronóstico independiente (Villers y cols., 1990) <sup>446</sup>.

Esta invasión casi siempre resulta de la extensión directa del tumor a la pared de los conductos eyaculadores en el interior de la próstata y cerca de su base (Villers y cols., 1990) <sup>446</sup>. Por lo tanto, las vesículas seminales son primero invadidas cerca de su unión con la base prostática.

Los cánceres que crecen cerca de la base tienen tendencia a invadir las vesículas seminales cuando son todavía pequeños y bien diferenciados. Los carcinomas de la zona apical y de transición, generalmente no pueden alcanzar la superficie de la base prostática hasta ser grandes y pobremente diferenciados <sup>407</sup>.

Walsh y Jewett (1980) <sup>456</sup> consideraron que la invasión tumoral de las vesículas seminales es un indicador pronóstico más fuerte que la invasión capsular aislada. Se ha referido que 26 % de los pacientes con invasión de las vesículas

seminales presentan un periodo libre de enfermedad de 10 años frente a un 72 % de pacientes con invasión mínima de la cápsula<sup>456</sup>.

La mayoría de cánceres con invasión de las vesículas seminales son de gran volumen, elevado grado de Gleason y, con frecuencia, se asocian con perforación capsular y metástasis linfáticas<sup>49,325,446</sup>.

Una apropiada predicción de estos factores puede ser clínicamente útil para establecer qué pacientes podrían ser candidatos a radioterapia, prostatectomía radical con separación de estructuras nerviosas o para vigilancia periódica<sup>49</sup>.

Los pacientes con infiltración de vesículas seminales no se benefician de la cirugía radical por lo que se han desarrollado técnicas para su detección preoperatoria fiable, fundamentalmente la biopsia de vesículas seminales, dada la dificultad de los métodos diagnósticos no cruentos para valorar su infiltración con carácter preoperatorio<sup>13,427,438</sup>.

#### 1.2.2.7.- Invasión perineural

Aunque la invasión perineural generalmente no es considerada un importante factor pronóstico<sup>61</sup>, en algunos estudios ha sido referida su asociación con un peor pronóstico<sup>76</sup>.

#### 1.2.3.- ESTADIO

Para el estadije del carcinoma prostático son, generalmente, utilizados dos métodos diferentes, la clasificación de Whitmore-Jewett o la clasificación TNM. En nuestro medio hospitalario y en el periodo en el que el presente estudio fue realizado, utilizamos una forma simplificada de la primera de ellas.

### Clasificación de Whitmore-Jewett

. **Estadio A:** carcinoma incidental, hallazgo no sospechado previamente.

A.1.: en 3 o menos chips de resección.  
en 5% o menos del peso total resecado  
de 1cc o menos volumen.

bien diferenciado.

A.2.: multifocal o grado alto de indiferenciación.

A.3.: sospechado por elevación de marcadores.

. **Estadio B:** confinado a glándula prostática.

B.1.: afectación de un solo lóbulo < 1.5 cm.

B.2.: afectación de un solo lóbulo >1.5 cm.

B.3.: afectación de ambos lóbulos.

. **Estadio C:** localizado, pero extracapsular.

C.1.: infiltración a través de la cápsula.

C.2.: infiltración de cuello, trigono, vesículas seminales.

C.3.: infiltración de órganos adyacentes.

. **Estadio D:** carcinoma diseminado.

D.O.: elevación de marcadores sugiriendo diseminación sin evidencia por otras exploraciones.

D.1.: afectación ganglionar limitada, por debajo del nivel de iliacos.

D.2.: afectación ganglionar masiva, por encima de iliacos, o diseminación.

D.3.: metástasis hormonorresistentes

El problema principal de esta clasificación es la utilización de una mezcla de diferentes criterios y la dificultad para delimitar claramente algunos estadios<sup>10, 358</sup>.

El estadio tumoral es un indicador pronóstico corrientemente usado en el cáncer de próstata; es fácilmente reproducible y se correlaciona bien con la supervivencia del paciente. Sin embargo, autores como Zincke y cols.<sup>474</sup> no encuentran ninguna significación del estadio clínico al analizar la mortalidad causa específica, considerando que tiene un impacto leve en cuanto a la progresión sistémica. Por su parte los sistemas de gradación están propensos a la subjetividad individual (Harada y cols., 1977)<sup>198</sup>, sin embargo son más seguros en la predicción del pronóstico en los grados extremos (tumores bien diferenciados y pobremente diferenciados). La amplia mayoría de tumores, no obstante, caen dentro de los grados intermedios y tienen un curso impredecible (Cohen y cols., 1990)<sup>72</sup>.

La valoración del estadio clínico de forma aislada como pronóstico de recurrencia local viene limitada por los problemas inherentes a los métodos de estadije, con una infravaloración clínica que alcanza un 40-50% de los cánceres de próstata etiquetados como intraglandulares<sup>88,115,274,333</sup>.

El supraestadije clínico representa otra fuente potencial de error, con el riesgo de privar a algunos pacientes de una teórica probabilidad de curación, representando hasta un 22% en alguna serie<sup>299</sup>.

La asociación del estadio con otros parámetros aumenta su valor pronóstico<sup>407</sup>. En general, el estadio patológico así como el grado histológico, los hallazgos morfológicos del grado histológico y la extensión tumoral (volumen tumoral o porcentaje de tumor) en el tejido prostático, son importantes factores pronóstico, sin embargo, no tienen la capacidad suficiente para predecir individualmente la evolución de cada paciente<sup>146,148</sup>. Como otros predictores, estos índices pronósticos indican tendencia o probabilidad de evolución; no son predictores absolutos de futuro<sup>218</sup>.

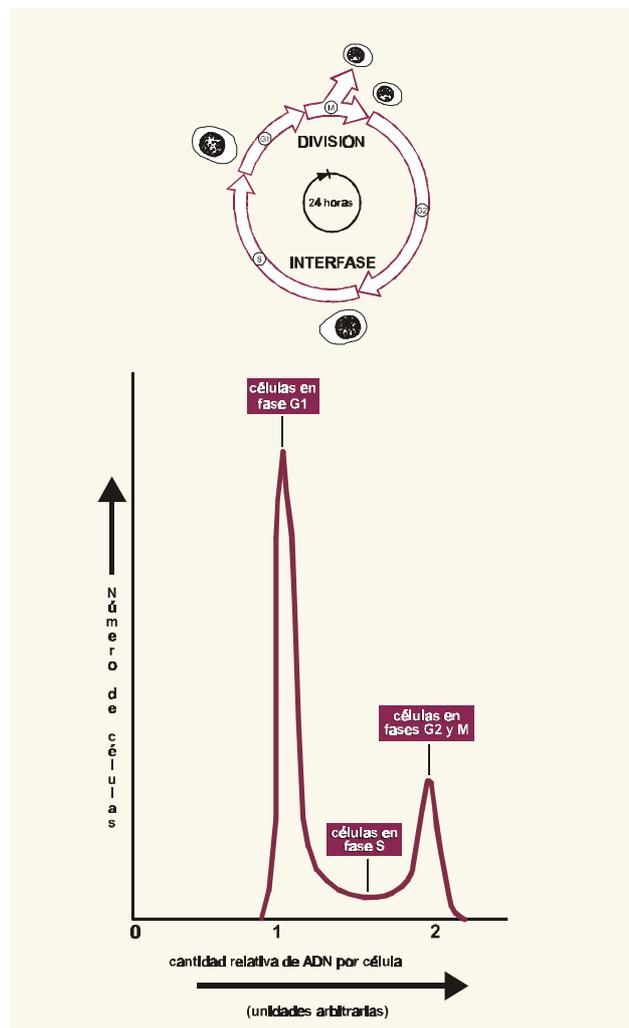
## 1.2.4.- ANÁLISIS DEL ADN EN TUMORES

### 1.2.4.1.- Ciclo celular

Numerosos estudios citogenéticos han puesto de manifiesto la existencia de aberraciones cromosómicas en varias neoplasias, pudiendo ser identificadas por técnicas de biología molecular o mediante una forma más grosera, a través de técnicas de citometría dinámica o estática.

El ciclo celular puede ser dividido en varios estadios de acuerdo con la cantidad de ADN presente en cada momento (fig. 1).

Figura 1



Tal y como se muestra en esta figura, la célula, una vez completada la mitosis (M), entra en un periodo presintético o fase G1 en la cual el núcleo tiene un contenido diploide o 2N de ADN, esto es 23 pares de cromosomas. Las células que están ciclando en ese momento se consideran en fase G1, mientras que aquellas que tienen un contenido de ADN de 2N pero no están ciclando son consideradas en fase G0 o periodo de reposo. En un momento dado del ciclo celular, denominado arranque o "start", la célula comienza a replicar su ADN, en un proceso de duración variable durante el cual tienen un contenido de ADN entre 2N y 4N.

El conocimiento molecular de la regulación del ciclo celular ha sido posible gracias al uso de levaduras como modelo de célula eucariótica. En estos organismos unicelulares el ciclo celular es regulado fundamentalmente en dos puntos: 1) arranque o "start" dentro de la fase G1, a partir del cual la célula está comprometida en la síntesis de ADN, y 2) el paso G2-M. Ambos puntos de transición requieren la actividad de la proteína-serin-kinasa cdc2 en conjunción con una de las proteínas conocidas como ciclinas<sup>106</sup>; las ciclinas mitóticas intervienen en la transición G2-M, mientras que las ciclinas G1 intervienen en la transición G1-S. En vertebrados las ciclinas G1 no han sido completamente caracterizadas pero se han propuesto varias proteínas como el equivalente humano de las ciclinas G1 de levaduras: ciclinas C, D y E.

Existen datos indirectos que implican a las ciclinas en la patogénesis de las neoplasias. Con frecuencia los tumores son aneuploides y esto podría ser la consecuencia de una disrupción del ritmo del ciclo celular debida a mutaciones en las ciclinas<sup>196</sup>.

Por otro lado, han sido referidas múltiples interacciones entre oncogenes/genes supresores y proteínas del ciclo celular. Así, por ejemplo, estudios de interacción entre el gen supresor p53 y el ciclo celular<sup>249</sup> han señalado que la

proteína p53 actúa como control de calidad del ADN en el ciclo celular. Así, en células que han sufrido alteración del ADN, el p53 retrasa la progresión del ciclo hasta que la célula ha tenido tiempo de reparar el ADN.

#### 1.2.4.2.- Contenido en ADN y fracción de proliferación tumoral (fase S)

##### 1.2.4.2.1.- Citometría de flujo

La citometría de flujo (CF), técnica de análisis celular automatizado desarrollada a partir de 1969, ha aportado importantes conocimientos en el campo de la patología tumoral en las últimas décadas.

Por medio de esta técnica podemos disponer de una muestra de tumor sólido y mediante procedimientos de disociación celular (por ejemplo digestión enzimática con pepsina) podemos separar o disgregar la práctica totalidad de sus células. Posteriormente estas células pueden ser a su vez suspendidas en una solución <sup>72,102,195</sup> y ser pasadas individualmente y a gran velocidad (10.000 células por segundo, o preferiblemente a un flujo de 500 células/segundo) por un aparato denominado citómetro de flujo, que, a través de un área sensora recoge señales ópticas y eléctricas. Estas señales son integradas y analizadas en un procesador informático. Los parámetros analizados <sup>50,74,183,444</sup> pueden ser intrínsecos a las poblaciones celulares y, por tanto, no requieren tinción celular, tales como tamaño, forma, contenido en pigmento, etc, o pueden ser extrínsecos y entonces requieren tinción con fluorocromos (propidio o etidio) aportando datos concernientes a antígenos de superficie, proteínas plasmáticas, estructura cromática nuclear, contenido en ARN, y contenido del ADN nuclear. Este último nos permite saber la concentración de ADN en las células neoplásicas.

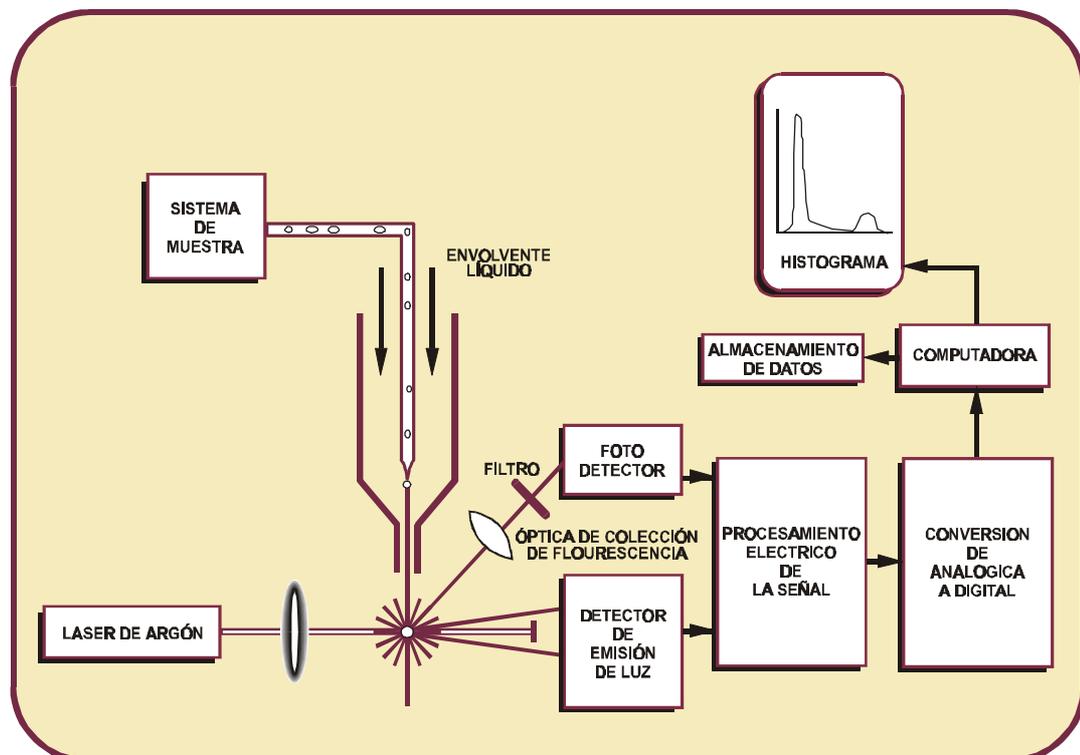
Cuando un elevado número de células es analizado por citometría de flujo se generan histogramas de ADN, que no son más que las representaciones gráficas del

contenido de ADN de la población celular estudiada. En estos histogramas se puede analizar tanto la ploidía como la actividad proliferativa del tumor.

De una forma sucinta un citómetro de flujo consta de los siguientes elementos 50:

- 1) Un sistema fluídico que transporta células a un área sensora.
- 2) Un láser, generalmente de argón, que produce una luz monocromática, que al incidir sobre las células emite señales.
- 3) Un dispositivo electrónico que transforma los impulsos de luz en señales eléctricas (según número, tamaño y características específicas celulares), y que mediante un convertidor las modifica a señales digitales o numéricas.
- 4) Un sistema computador que permite el almacenamiento de datos y su análisis.

Figura 2



#### 1.2.4.2.2.- Bases de estudio del análisis de ADN mediante citometría de flujo

El análisis en el laboratorio mediante CF del contenido en ADN celular se fundamenta en una serie de propiedades:

1) La cuantificación del ADN mediante CF está en estrecha relación, aunque no del todo estricta, con el número de cromosomas <sup>454</sup>. Las células normales son euploides y tienen contenido normal de ADN pudiendo ser diploides (2N) como son las células somáticas, o haploides (1N) cuando poseen la mitad de carga cromosómica, como ocurre en la etapa meiótica de las células germinales. Las células neoplásicas se separan en dos grupos basados en el estado de ploidía ( contenido en ADN celular): células tumorales diploides que tienen cantidad "normal" de ADN, y células tumorales aneuploides que tienen cantidad anormal de ADN. Dentro de estas últimas, cuando el contenido de ADN se encuentra por encima de lo normal se les denomina a su vez hiperdiploide y cuando es menor se les llama hipodiploide <sup>50,107,158</sup>. Otra forma de definir la aneuploidía sería la presencia de un número anormal de cromosomas, bien por no ser un múltiplo de 23 (haploides), o por no tener la dotación habitual de 46 cromosomas <sup>107</sup>.

En resumen, que términos tales como diploide, aneuploide o tetraploide no son rigurosamente ciertos cuando se aplican a la medición del ADN celular por CF. Utilizados en un sentido estricto, se aplican a la evaluación citogenética del número de cromosomas en una célula, y no a la estimación cuantitativa del contenido en ADN por CF. Parece preferible la terminología de ADN normal o anormal, en vez de diploidía o aneuploidía, aunque estos términos siguen teniendo vigencia actual.

2) Las células normales en los diferentes estadios del ciclo celular tienen distinto contenido en ADN <sup>107,444</sup>:

a) Fase *G0-G1*: las células están en reposo o en preparación de síntesis por lo que poseen un contenido diploide en ADN ( $2N$ ),

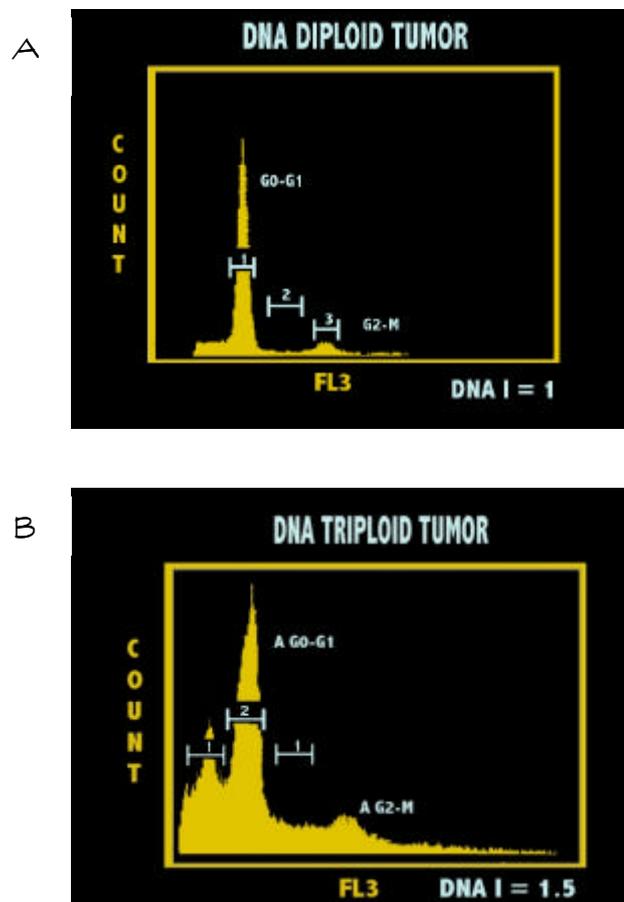
b) Fase de síntesis "*S*": hay un incremento progresivo de formación de ADN antes de duplicar su contenido nuclear.

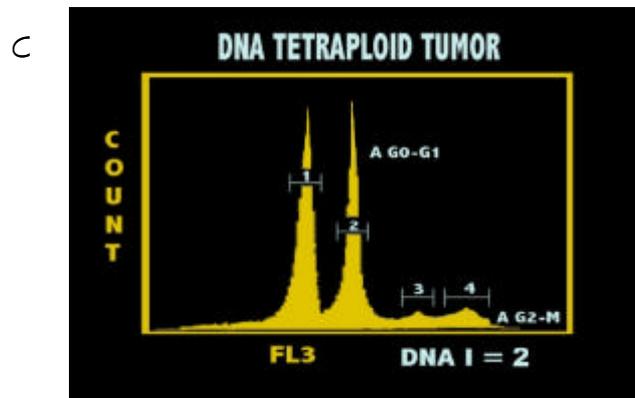
c) Fase *G2*: las células tienen dos juegos de cromosomas y consiguientemente el doble de contenido de ADN de una célula diploide (tetraploide -  $4N$  -).

d) Fase *M*: etapa de mitosis, en la que se han formado dos células hijas, que en conjunto suman el contenido de ADN de las dos células diploides.

El estudio de histogramas nos permite relacionar el número de células con su concentración o contenido en ADN. Un ciclo celular normal quedaría representado como se muestra en el histograma A de la fig. 3.

Figura 3





Como puede apreciarse en el histograma A de la fig. 3, la mayor parte de las células está en fase *G0-G1*, un menor número se encuentran en fase de síntesis y se aprecia un pequeño pico de células que están en fase *G2-M*, que han duplicado su contenido en ADN y son por lo tanto tetraploides (4N).

La CF permite estimar el número de células ciclando en una población tumoral, dato conocido como fracción proliferativa del tumor, de modo que tejidos cuyas células ofrecen baja fracción proliferativa tienen disminuido el porcentaje de células en fase S y viceversa.

3) Las células neoplásicas suelen tener anormal contenido en ADN (aneuploides), mostrando generalmente mayor cantidad de ácidos nucleicos que las células normales, fenómeno que es detectado por el citómetro de flujo y reflejado por la aparición de picos anormales en el histograma del ciclo celular<sup>165,444</sup>. La ploidía o cantidad de ADN de una población celular se determina mediante el índice de ADN (I ADN). Éste se calcula dividiendo el contenido de ADN de la población en estudio por el de una población diploide modelo, utilizándose habitualmente linfocitos humanos, eritrocitos de pollo o cualquier otra población celular benigna.

$$I \text{ ADN} = \frac{\text{Contenido en ADN de la población en estudio}}{\text{Contenido en ADN de la población de referencia}}$$

O de otra manera, el I ADN se cuantifica con histogramas midiendo la media del canal del pico G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> tumoral, con la media del canal de un pico diploide <sup>26,203,460</sup>. Esto se expresa por la siguiente fórmula:

$$\text{I ADN} = \frac{\text{Ubicación pico } G_0 - G_1, \text{ población problema}}{\text{Ubicación pico } G_0 - G_1, \text{ población diploide}}$$

El I ADN de poblaciones celulares normales o tumorales diploides debe ser 1, por coincidencia en el mismo canal de ambos picos <sup>165,444,460</sup>. En poblaciones celulares aneuploides el I ADN es distinto a 1. Por ejemplo en el histograma B de la figura 3 aparece un pico anormal 3N (I ADN=1.5), y en el histograma C en 4N y por lo tanto el I ADN = 2.

La ploidía tumoral está relacionada con el cariotipo, aunque son dos conceptos diferentes <sup>285</sup>. Si correlacionamos la ploidía con el índice de ADN <sup>50, 107, 158</sup> y con resultados citogenéticos podemos establecer las siguientes categorías de tumores:

Tabla I

Citometría de flujo	I ADN	Citogenética
Diploide	1	46 cromosomas (2n)
Hipodiploide	< 1	< 46 cromosomas
Hiperdiploide	> 1	> 46 cromosomas
Tetraploide	2	92 cromosomas (4n)
Aneuploide	1 < ó > 1	Cualquier modificación del número de cromosomas

En lo que se refiere a la correlación ploidía del ADN y fiabilidad pronóstica para distintos tumores, del trabajo de Koss y cols.<sup>242</sup> extraemos el siguiente esquema:

Tabla II

<b>Fuerte fiabilidad pronóstica</b>	Carcinoma de vejiga Carcinoma de próstata Carcinoma de ovario y endometrio Melanoma cutáneo
<b>Probable fiabilidad pronóstica</b>	Carcinoma de mama Carcinoma colorectal
<b>Débil fiabilidad pronóstica</b>	Carcinoma renal Carcinoma pulmonar Carcinoma de cuello uterino
<b>Nula o dudosa fiabilidad pronóstica</b>	Carcinoma gástrico Carcinoma tiroideo Linfoma

Entre los factores pronóstico experimentales la ploidía del ADN es considerada, generalmente, de valor pronóstico <sup>285</sup>.

La implicación biológica de la aneuploidía en tumores malignos es variable y su relación con la historia natural es algo diferente para cada tipo de cáncer <sup>407</sup>. Numerosos autores han señalado que el desarrollo de aneuploidía en el cáncer de la próstata está relacionada con la progresión tumoral (Frankfurt y cols., 1984; Jones y cols., 1990 ;Lee y cols., 1988; Lundberg y col., 1987; Stephenson y cols., 1987; Winkler y cols., 1988) al igual que en muchos otros cánceres, pero su valor práctico en la estimación pronóstica de esta neoplasia debe, aún, ser determinado <sup>407</sup>.

Se ha demostrado una buena correlación entre la gradación histológica y los resultados de análisis de ADN por citometría de flujo en el carcinoma de la próstata <sup>411, 433</sup>. La frecuencia de aneuploidía es elevada en tumores pobremente diferenciados y la supervivencia parece estar adversamente afectada por el aumento del índice de ADN <sup>194, 232, 285</sup>. Visakorpi y cols., en sus resultados de amplias series de pacientes con cáncer de próstata, han señalado que la aneuploidía del ADN se

correlaciona con tumores de alto grado, estadio avanzado y consecuentemente corto intervalo de progresión y muerte <sup>232</sup>.

Respecto a la relación ploidía y tamaño tumoral se ha referido que en el cáncer de próstata la aneuploidía es infrecuente en tumores con volumen menor de 4 ml <sup>407</sup>. A medida que aumenta el estadio clínico y que el volumen tumoral se hace mayor de 4 ml la aneuploidía es más frecuente, aunque varios estudios han demostrado que una tercera parte de los carcinomas prostáticos se mantienen diploides, incluso en estadios avanzados <sup>407, 466</sup>.

En el análisis de la relación ploidía y tratamiento, estudios como el de Tribukait <sup>432</sup> mostraron que aquellos pacientes con tumores ADN diploides, con contenido de ADN normal, tratados con deprivación androgénica tenían un pronóstico a largo plazo marcadamente mejor y raramente morían de cáncer de próstata. En contraste, los pacientes con cánceres ADN tetraploides y aneuploides progresaban desfavorablemente y morían pocos años después del diagnóstico. Resultados similares fueron también referidos por Miller y cols. (1991) <sup>256, 294</sup>.

Incluso en otro estudio de pacientes en estadio D1 tratados con linfadenectomía pélvica bilateral y prostatectomía radical retropúbica, se refiere que la eficacia de la ploidía ADN en estratificar los resultados finales fue clara <sup>256</sup>. Los pacientes con tumores con contenido de ADN normal o cánceres diploides (incluso con nódulos linfáticos pélvicos) casi nunca progresaban y/o fallecían <sup>256</sup> por cáncer de próstata (incluso a los 10-15 años de seguimiento) cuando eran sometidos a ese tratamiento.

Algunos autores han estimado una supervivencia causa-específica de 10 años para pacientes con carcinoma de próstata aneuploide o tetraploide (Winkler y cols.,1988; Myers y cols.,1992; Zincke y cols.,1992) <sup>314, 466, 477</sup>.

#### 1.2.4.2.3.- Coeficiente de Variación

Un factor importante en el análisis de los histogramas es el coeficiente de variación (CV) el cual nos indica la precisión de las determinaciones de ADN. No hay un consenso a partir del cual los histogramas generados se pueden interpretar. Por norma general se acepta que los tumores sólidos en fresco deben tener CV menor del 8 % y las muestras de parafina coeficientes más altos, aceptándose como válidos hasta un 10 %. En muchos trabajos no se describe el CV, lo que hace difícil la comparación de resultados entre diferentes estudios<sup>89,460</sup>.

Cuando se estudian tumores fijados en parafina hay varios problemas a tener en cuenta en el momento de la interpretación de los histogramas. Debido a la digestión enzimática realizada durante el proceso de preparación, se genera una gran cantidad de detritus que pueden interferir en la interpretación de la fase S, sobrestimando su porcentaje. Por otro lado, la resolución del pico G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> es menor que en las muestras en fresco, por lo que algunos tumores aneuploides cercanos a la diploidía pueden ser clasificados como diploides. No obstante, en numerosos estudios en los que se compara la ploidía en muestras en fresco con la de los tumores fijados en parafina no se observan diferencias.

#### 1.2.4.2.4.- Índice proliferativo

La actividad proliferativa de un tumor puede ser valorada de forma estática, mediante el índice mitótico, o dinámica por medio de citometría de flujo. Como ha sido ya descrito, la distribución de células tumorales en los diferentes compartimentos del ciclo celular puede ser calculada en los histogramas generados por citometría de flujo.

La mayor parte de autores consideran que el porcentaje de células en fase S expresa la tasa de proliferación y la velocidad de crecimiento de una población

tumoral, por lo que a las neoplasias que presentan una fase S elevada se les presupone peor pronóstico <sup>107, 165, 444</sup>.

Numerosos estudios afirman que el porcentaje de células que sintetizan ADN (fase S) refleja el grado de proliferación del tumor y por lo tanto su comportamiento agresivo <sup>86, 155, 428</sup>. Sin embargo otros trabajos de tumores sólidos ponen en duda el valor del análisis de la fase S como valor predictivo del comportamiento clínico de todos los tumores <sup>155, 204, 319, 417, 454</sup>.

La proporción de células en fase S de un tumor se conoce habitualmente como "fracción de fase S" (FFS), "fracción celular en fase S" (FCS) o "fracción proliferativa"(FP), no obstante se hacen equivalentes otros términos como actividad proliferativa, capacidad proliferativa, potencial proliferativo, etc <sup>107, 165, 203</sup>.

Es importante señalar que en un histograma las diferentes fases del ciclo no están totalmente separadas sino que existen áreas de solapamiento. Así, las células en fase S precoz pueden solaparse con el área G0-G1 del histograma y las de la fase S tardía superponerse con la región G2-M. Por este motivo se han diseñado modelos matemáticos basados en distribuciones gaussianas y ecuaciones polinómicas que permitan estimar la proliferación de células en fase proliferativa.

Por esto, en algunos estudios, se considera de interés pronóstico la suma de la fase S y de la G2-M, lo que se conoce como "fracción hiperdiploide" <sup>165</sup>, o con otros términos como "índice de proliferación" (IP) que se define como :

$$IP = (S+G2)/(G1+S+G2) \times 100$$

o bien:

$$IP = 100 (S+G2+M)/(G0G1+S+G2+M)$$

El ciclo celular muestra amplias variaciones en cuanto al porcentaje de células en fase proliferativa. Así, mientras algunos tumores aneuploides presentan fracciones de proliferación bajas, otros diploides las muestran elevadas. No obstante, existe una buena correlación entre la ploidía y la proporción de células en fase S de tal forma que tumores aneuploides tienen fases S más elevadas<sup>108</sup>.

Respecto a esas variaciones, es de interés enfatizar que el carcinoma prostático es un tumor heterogéneo que puede contener células de variada tendencia proliferativa o de un solo clon<sup>205</sup>. Este aspecto debe ser considerado cuando se utilizan con valor pronóstico datos basados en el tamaño tumoral pues no siempre tumores con bajo volumen tumoral (<0,5 cc) se relacionan con menor velocidad de crecimiento.

## 1.2.5.- OTROS ESTUDIOS PATOLÓGICOS ESPECIALES

### 1.2.5.1.- Inmunohistoquímica (expresión de oncogenes y genes de supresión tumoral)

#### 1.2.5.1.1.- Genética molecular

Esta nueva vía de investigación de rápido desarrollo en los últimos años permite estudiar e identificar los acontecimientos moleculares que sustentan la iniciación y progresión tumoral.

Si bien en los tumores producidos por oncogenes la carcinogénesis es el resultado de la ganancia de una función genética, generalmente producida por la introducción de un virus o por una mutación en el genoma sobre un protooncogén, el mecanismo de actuación de los antioncogenes es diferente. En estos, el mecanismo básico es la pérdida de regiones específicas que en condiciones normales regulan el

crecimiento y la diferenciación celular, y así suprimen indirectamente el desarrollo tumoral. Generalmente para el desarrollo tumoral se requiere la pérdida de función en ambos alelos de un gen supresor de tumores o antioncogén <sup>68, 281</sup>.

#### 1.2.5.1.2.- Antioncogén p53

Las mutaciones del antioncogén p53 son una de las alteraciones genéticas más comunes en el cáncer humano.

Este gen está localizado en la banda cromosómica 17p13. La pérdida alélica de 17p, por delección o recombinación mitótica, está presente en varios carcinomas y se asocia a la progresión individual de adenomas a carcinomas <sup>136, 451</sup>.

Se sabe que el gen p53 <sup>23</sup> codifica la proteína p53. Esta es una fosfoproteína que se ha encontrado formando un complejo en las células transformadas por el virus SV40.

Varias hipótesis se han postulado para explicar como actúa el p53 en condiciones normales y como regula el ciclo celular:

- 1) el p53 puede regular el ensamblaje del complejo de replicación del ADN del virus SV40. Para ello, la proteína p53 se une al antígeno SV40 impidiendo la formación de ese complejo necesario para la iniciación y propagación del virus SV40.
- 2) el p53 podría actuar como un transactivador de la transcripción de genes, bien promoviendo o bien reprimiendo la síntesis de ARN, quizás a través de un conjunto de genes que efectúan la transición del estadio G1 terminal a la fase S del ciclo celular.

La importancia de la mutación del p53 en la patogenia del carcinoma de la próstata fue inicialmente referida por Rubin y cols. <sup>365</sup> e Isaacs y cols. <sup>221</sup>.

Los resultados de los estudios inmunohistoquímicos del p53 en el cáncer de próstata son, actualmente, objeto de controversia. La frecuencia de expresión positiva en esta neoplasia varía ampliamente según las diferentes series. Por otro lado, se ha objetivado positividad también en próstatas normales o hiperplásicas y no existe consenso en cuanto a la correlación inmunotinción positiva para la p53 y otros parámetros como, por ejemplo, el grado histológico.

Foster y cols.<sup>147</sup> observaron expresión positiva para la p53 en glándulas prostáticas sin cualquier signo de malignidad. Por el contrario, otros grupos<sup>402,448</sup> no objetivaron en sus series expresión de la p53 en glándulas normales o hiperplásicas.

Algunos autores<sup>147, 282, 402</sup> no encuentran asociación significativa entre la existencia de inmunotinción positiva para la p53 y el grado histológico. Sin embargo, otros como Kallakury y cols<sup>235</sup> o Visakorpi y cols<sup>448</sup> refieren una significativa correlación entre los dos parámetros de forma que los tumores con mayor grado histológico presentan positividad más frecuentemente.

La positividad para la p53 en glándulas prostáticas normales o hiperplásicas ha llevado a sugerir que la mutación del p53 podría representar un evento precoz en el proceso neoplásico y que su expresión en células basales de glándulas prostáticas hiperplásicas podría representar una lesión premaligna. Este planteamiento hipotético es discutible pues, de acuerdo con los resultados de ciertos trabajos, la mayor parte de estas mutaciones en hiperplasia benignas son silentes. Por otra parte, algunos hallazgos llevan a pensar que la mutación del p53 es un hecho tardío en la progresión de esta neoplasia. Así, se ha indicado mayor frecuencia de inmunotinción positiva en las metástasis óseas por carcinoma de próstata<sup>317, 16</sup> y también que esta mutación podría estar relacionada con la transición para enfermedad hormono-resistente<sup>317</sup>.

Se ha sugerido que la acumulación de la proteína p53, la cual, normalmente, indica mutación, es predictiva de pobre supervivencia sólo para un pequeño porcentaje (8 %) de pacientes con adenocarcinoma de próstata <sup>448</sup>.

Algunos pacientes con adenocarcinoma de la próstata muestran elevación del c-myc <sup>141</sup>, sin embargo, el significado pronóstico de este hallazgo es desconocido.

El oncogén más comúnmente mutado en el cáncer humano, el ras, raramente está alterado en el adenocarcinoma prostático humano <sup>191, 218</sup>.

Se han descrito alteraciones en la inmunorreactividad de las oncoproteínas neu y del receptor del factor de crecimiento epidérmico <sup>220,270,282,449</sup>. Sin embargo, se ha señalado que aunque la inmunorreactividad del receptor del factor de crecimiento epidérmico es de significado pronóstico, no presenta valor pronóstico independiente <sup>449</sup>.

La inactivación de otro gen supresor, el gen Rb, ha sido también descrita como de importancia en la progresión del carcinoma prostático <sup>44</sup>.

#### 1.2.6.- OTROS FACTORES PRONÓSTICOS EN INVESTIGACIÓN

Entre los otros factores pronóstico tisulares en experimentación para el adenocarcinoma de próstata se incluyen: características nucleares, marcadores enzimáticos, oligosacáridos, nuevos antígenos prostáticos definidos por anticuerpos monoclonales, estado del receptor de hormonas esteroideas, marcadores de diferenciación, neovascularización, receptores de factor de crecimiento y anormalidades en el cariotipo <sup>218</sup>.

El valor pronóstico del volumen nuclear medio ha sido demostrado en varios estudios<sup>404</sup>.

En el estudio de Fujikawa y cols.<sup>160</sup> se informa que el volumen nuclear medio y el estadio clínico son los dos factores pronóstico independientes más poderosos para predecir los intervalos libres de progresión así como la supervivencia enfermedad-específica. Sus resultados indican que el volumen nuclear medio es, en términos pronóstico, superior al grado morfológico de malignidad, valorado por el score de Gleason.

La morfología nuclear en el carcinoma de la próstata analizada por métodos de digitalización computarizados ha demostrado significancia pronóstica cuando se han valorado factores como la redondez nuclear, la elipticidad<sup>218</sup> y el perímetro nuclear<sup>132</sup>. En los trabajos de Diamond y cols.<sup>104</sup> y de Epstein y cols.<sup>119</sup> se encontró que el factor de redondez nuclear era incluso mejor predictor de potencial maligno que la gradación de Gleason. Sin embargo, el tiempo necesario para realizar la digitalización y el costo de los sistemas de morfometría nuclear limitan el uso generalizado de estos factores pronósticos morfológicos en la rutina clínica<sup>218</sup>. Por otra parte, y según algunos autores<sup>127</sup> tales sistemas de análisis parecen proporcionar poca información pronóstica adicional una vez determinado el grado de Gleason.

La prominencia nucleolar, determinada por métodos ultraestructurales, es también un factor pronóstico significativo y objetivo<sup>422</sup>.

Como hallazgos nucleares adicionales en las células del adenocarcinoma prostático se han descrito las regiones con organización nucleolar argirofila (Ag-NORs) y el área de superficie nucleolar<sup>218</sup>. El número Ag-NORs y el área, generalmente aumentan desde la hiperplasia prostática a neoplasia prostática intraepitelial (PIN) y a carcinoma<sup>101, 267, 386</sup>, no obstante la variación inter-observador puede representar una dificultad práctica<sup>265</sup>.

También se ha referido que las Ag-NORs tienen valor pronóstico en la enfermedad metastásica<sup>174</sup>. Sin embargo, serán necesarias nuevas investigaciones para definir la relación Ag-NORs y puntos clínicos esenciales como progresión y supervivencia.

En la búsqueda de nuevos marcadores pronósticos se han desarrollado nuevos métodos para análisis de la textura nuclear con el objetivo de estudiar el papel de la organización de la cromatina<sup>90, 469</sup>.

Se ha referido que la textura de la organización de la cromatina en los carcinomas primarios, antes de la ablación androgénica, es un fuerte factor pronóstico independiente<sup>231, 232</sup>. Sin embargo, la interpretación biológica de este parámetro es difícil y los estudios son escasos por lo que se requieren nuevas investigaciones.

#### 1.2.6.1.- Diferenciación neuroendocrina

Recientemente se han aportado nuevos conocimientos al estudio del cáncer de próstata con el análisis de células neuroendocrinas<sup>105</sup>. Al igual que en otros órganos, las células eosinófilas granuladas teñidas con Plata-Grimelius han sido reconocidas entre las células secretoras en la hiperplasia prostática benigna y en carcinomas prostáticos. Estas células secretan proteínas neuroendocrinas y son inmunohistoquímicamente positivas para cromogranina A y enolasa específica neuronal. Se ha encontrado co-expresión del PSA y marcadores neuroendocrinos, especialmente la cromogranina A.

Por otro lado, se ha observado positividad en las células tumorales prostáticas no-neuroendocrinas cerca de las células tumorales neuroendocrinas. Esto puede sugerir que las células neuroendocrinas segregan sustancias que estimulan la cinética proliferativa<sup>105</sup>.

Cohen y cols.<sup>71, 72</sup> observaron peor pronóstico en pacientes con carcinoma prostático diferenciado neuroendocrinológicamente que en aquellos carcinomas de la próstata que eran negativos para células neuroendocrinas.

#### 1.2.6.2.- Expresión del oligosacárido "sialyl-Lewis<sup>x</sup>"

Todos los carcinomas humanos estudiados, hasta la fecha, muestran cambios en los carbohidratos de la superficie celular<sup>232, 443</sup>. Las funciones biológicas de estos carbohidratos son, en su mayor parte, desconocidas; no obstante, de las evidencias obtenidas, se puede decir que algunos de ellos están implicados en los procesos de adhesión celular durante el desarrollo embriológico, en la migración celular durante la cicatrización de heridas y en la progresión tumoral y desarrollo de metástasis<sup>168, 195, 296, 443</sup>.

Los estudios de Jorgensen y cols.<sup>231</sup> refieren que el oligosacárido sialyl Lewis<sup>x</sup> está implicado en la diseminación tumoral y que los tumores prostáticos avanzados que expresan fuertemente este oligosacárido tienen un pobre pronóstico. Por otra parte la expresión del oligosacárido sialyl Lewis<sup>x</sup> puede ser de valor para programas futuros de tratamiento, esencialmente en carcinomas con expresión positiva ya que estos parecen ser andrógeno independientes<sup>232</sup>.

#### 1.2.6.3.- Estudios cromosómicos/cariotipo

Cambios clonales del cariotipo se han asociado con resultados desfavorables en pacientes con cáncer de próstata. Se han identificado alteraciones citogenéticas que afectan a cromosomas específicos (particularmente el 2, 7, 8, 10, y 16)<sup>264</sup> pero, hasta la fecha, no se ha demostrado su valor pronóstico. La pérdida de heterocigocidad ha sido, frecuentemente, encontrada en el carcinoma de próstata. En este sentido se ha sugerido que la pérdida del 17p puede ser un marcador de carcinomas avanzados de la próstata<sup>266</sup> y, de esta forma, un factor pronóstico.

#### 1.2.6.4.- Inmunorreactividad de la PAP

Pocos estudios han valorado la relación entre la inmunorreactividad PAP y el comportamiento biológico del tumor <sup>124, 223, 396</sup>. En el estudio de Sakai y cols.<sup>371</sup> se refiere una alta supervivencia cáncer-específica en pacientes con marcada expresión PAP, y en pacientes con reducida expresión PAP un peor pronóstico. Según los resultados de este estudio la inmunorreactividad de la PAP es un buen factor pronóstico independiente en el carcinoma prostático.



## 2.-OBJETIVOS

El curso clínico del carcinoma de próstata es ampliamente variable y de difícil predicción. Consecuentemente es imprescindible establecer una distinción entre los tumores de alto riesgo de progresión y los de bajo riesgo. En el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Canarias, el carcinoma prostático representa la tumoración maligna más frecuente del tracto génito-urinario en el varón tras el carcinoma de células transicionales de vejiga urinaria (carcinoma papilar). Por otra parte, y en el presente, disponemos en nuestro centro hospitalario de mejores procedimientos de diagnóstico clínico, y en el terreno de la patología, tenemos la posibilidad de aplicar técnicas más sofisticadas de detección inmuno-histoquímica, de expresión de antioncogenes anómalos ( p53 mutado), así como de determinación de ploidía e índice proliferativo de células tumorales mediante citometría de flujo. Todas las consideraciones anteriormente expuestas, nos han estimulado al planteamiento del presente trabajo, en el que estudiamos desde el punto de vista anatomo-clínico 108 casos de carcinoma prostático con especial referencia a factores pronóstico. Con ello nos proponemos los siguientes objetivos:

1) Identificar los posibles factores pronóstico de tipo clínico de los 108 pacientes con carcinoma de próstata seguidos en el Servicio de Urología del Hospital Universitario de Canarias.

2) Obtener datos morfológicos de reconocido carácter pronóstico tales como el tipo histológico, grado de diferenciación, grado de anaplasia nuclear, etc. a través del material de biopsia de dichos pacientes (Departamento de Anatomía Patológica de dicho Centro-Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna). En el terreno de la inmuno-histoquímica nos interesa, también, tener experiencia personal en el significado pronóstico de la expresión de células tumorales del antioncogén mutado p53.

3) Analizar el contenido de ADN de dicho material biopsico y conseguir información pronóstica concerniente a la ploidía e índice de proliferación tumoral.

### 3.- PACIENTES Y MÉTODO

## 1.- RECOGIDA DE DATOS

El material para el estudio clínico del presente trabajo, lo comprende la información de los historiales clínicos de 108 pacientes afectados por carcinoma de la próstata seguidos clínicamente entre los años 1984 y 1993. Todos estos casos fueron diagnosticados y tratados en el Servicio de Urología del Hospital Universitario de Canarias. También fueron controlados regularmente durante todo el periodo de su enfermedad en este Servicio. Para el estudio anatómico-patológico, se ha utilizado el archivo de preparaciones y bloques de inclusión en parafina del Departamento de Anatomía Patológica de dicho Centro Hospitalario (Facultad de Medicina de La Laguna).

La fecha y causa de defunción fueron obtenidas a través de los historiales clínicos, de encuesta telefónica, de los registros civiles, y, en un menor número de casos, de los archivos de los cementerios de varios municipios. El tiempo de supervivencia fue calculado desde la fecha de diagnóstico histológico de carcinoma de próstata hasta la fecha de defunción. El seguimiento de los pacientes para valorar la supervivencia osciló entre 3 y 12 años concluyendo este seguimiento en Abril de 1996.

Para la obtención de los datos, fue diseñada una hoja de recogida de los mismos en la que se registran factores cualitativos y cuantitativos, siendo estos los siguientes:

Nombre y Apellidos:	
Número de Historia:	
Población:	
Teléfono:	
Fecha de nacimiento:	
Profesión:	

Motivo de la primera consulta

Estado civil:

Casado

Soltero

Viudo

Retención urinaria aguda

Hematuria

Prostatismo

Alteraciones bioquímicas

Dolor

Casual

Fecha de la primera consulta:

Fecha de diagnóstico:

Tacto rectal:

Aumento de volumen

Nódulo pequeño

Nódulo mediano

Nódulo grande

Multinodular

Pétreo

Delimitación:

Buena

Mala

Simetría:

Sí

No

Movilidad:

Buena

Mala

Pelvis congelada

Dolor al tacto:

Sí

No

Hematocrito:	
Hemoglobina:	
VSG:	
Creatinina:	
Fosfatasa alcalina:	
Fosfatasa ácida prostática:	
PSA:	

Urinocultivo:

Positivo	
Negativo	

Radiografía de tórax:

Metástasis	
No metástasis	

Ecografía prostática:

Indicativa	
No indicativa	
Dudosa	

Urografía intravenosa:

Normal	
Uropatía obstructiva	
Vejiga de lucha	
Hongo prostático	
Otros	

TAC pélvico:

Normal	
Intraglandular	
Extraglandular	

Gammagrafía ósea:

Metástasis	
No metástasis	

Gammagrafía hepática:

Metástasis	
No metástasis	

Biopsia:

Carcinoma de la próstata

Muestra histológica:

Cilindro

Resección transuretral

Pieza de prostatectomía

Estadio clínico-patológico en el momento del diagnóstico:

A	<input type="checkbox"/>
B	<input type="checkbox"/>
C	<input type="checkbox"/>
D	<input type="checkbox"/>

Evolución:

Buena	<input type="checkbox"/>
Aceptable	<input type="checkbox"/>
Regular	<input type="checkbox"/>
Mala	<input type="checkbox"/>
Fatal	<input type="checkbox"/>

Grado de Gleason:

1	<input type="checkbox"/>
2	<input type="checkbox"/>
3	<input type="checkbox"/>
4	<input type="checkbox"/>
5	<input type="checkbox"/>

Índice sumatorio VACURG/Gleason

1	<input type="checkbox"/>
2	<input type="checkbox"/>
3	<input type="checkbox"/>
4	<input type="checkbox"/>
5	<input type="checkbox"/>
6	<input type="checkbox"/>
7	<input type="checkbox"/>
8	<input type="checkbox"/>
9	<input type="checkbox"/>
10	<input type="checkbox"/>

Grado de diferenciación:

Bien diferenciado  
 Moderadamente diferenciado  
 Pobremente diferenciado


Necrosis:

No  
 Focal  
 Masiva  
 En comedo


Grado nuclear

I  
 II  
 III


Inflamación estromal:

Positiva  
 Negativa


Invasión perineural:

Positiva  
 Negativa


Penetración capsular:

Positiva  
 Negativa


Invasión de vesículas seminales:

Positiva  
 Negativa


Ploidía

Diploide  
 Tetraploide  
 Aneuploide no tetraploide


Índice proliferativo:

Menor de diez  
 Mayor de diez


Expresión de p53:

Positiva  
 Negativa


Fecha de defunción:

--

Causa de defunción:

--

## 2.- MÉTODOS DE ESTUDIO

### 2.1.- MÉTODO DE ESTUDIO CLÍNICO

Se revisaron los historiales clínicos de los pacientes para extraer datos correspondientes a :

- a) Edad de los pacientes.
- b) Semiología de los casos (signos y síntomas en relación con el proceso neoplásico) tanto antes como durante el seguimiento:
  - Prostatismo
  - Retención urinaria
  - Hematuria
  - Cuadro álgico
- c) Datos de la exploración clínica:
  - Tacto rectal (se valoró la presencia o no de dolor al tacto, la existencia de nódulos, el tamaño de la glándula así como su consistencia, simetría, delimitación y movilidad).
- d) Exploraciones complementarias:
  - Analíticas (hematocrito, hemoglobina, VSG, BUN, creatinina, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida prostática, antígeno específico (PSA) (después de 1989), y urinocultivos.
  - De Imagen (radiografía de tórax, ecografía prostática, gammagrafías ósea y hepática, ecografía hepática, renograma y urografía intravenosa).
- e) Extensión del proceso neoplásico (estadio clínico): no se incluyeron en este estudio los pacientes cuyo estadio clínico era desconocido; el estadije siguiendo la clasificación de Whitmore-Jewet había sido realizado con base

a la información del laboratorio de Anatomía Patológica y a los registros clínicos (examen rectal, radiografía de tórax, gammagrafía ósea y/o hepática, ecografía transrectal, ecografía abdominal, urografía excretora, tomografía computarizada pélvica.).

f) Datos de seguimiento de los pacientes:

- Exploraciones sucesivas
- Posibles recidivas y metástasis
- Fecha de defunción
- Causa de defunción

## 2.2.- MÉTODO DE ESTUDIO PATOLÓGICO

### 2.2.1.- Técnicas de microscopía óptica convencional

Para el estudio, tanto las muestras histológicas de biopsias antiguas como recientes, han sido fijadas en formalina al 4%, procesadas e incluidas en parafina. A continuación, los bloques de parafina, han sido seccionados en un microtomo Reichert-Jung 1130 Biocut, obteniéndose cortes con un grosor entre 5 y 7 micras. Fueron realizadas las siguientes tinciones:

#### 2.2.1.1.- Hematoxilina-eosina

A) Preparados.

A.a) Hematoxilina de Harris. Preparación.

##### Solución A

Hematoxilina en polvo 5 g.

Alcohol absoluto 50 cc.

##### Solución B

Alumbre potásico cristalizado 100g.

Agua destilada 800 cc.

(el alumbre se disuelve en caliente)

A las 24 horas de preparadas las soluciones, se mezclan A y B agregando 2,5 g. de óxido rojo de mercurio.

Hervir de 20 a 30 minutos y al apartarlo se pone en un matraz que se introduce en agua fría.

A.b) Eosina. Preparación

Eosina	2 g.
Agua destilada	160 cc
Alcohol al 95 %	640 cc
Ácido acético	8-10 gotas

B) Técnica

Se han de seguir los pasos que se indican a continuación:

1. Desparafinar haciendo dos pases de 10' en xilol.
2. Deshidratar mediante tres pases en alcohol de 96° y de 90°.
3. Lavar en agua destilada.
4. Teñir con hematoxilina de Harris 3 minutos.
5. Lavar.
6. Coloración de contraste: eosina durante 3 minutos.
7. Sin lavar, pases rápidos por alcohol de 90°, 96° y absoluto.
8. Pasar por carboxilol y dos veces por xilol.
9. Montar en Eukit.

2.2.1.2.- PAS - hematoxilina

A) Preparados.

A.a) Pararosanilina	0.5 g.
Ácido clorhídrico	5 cc

Agitando diluir.

A.b) Metabisulfito potásico	0.5 g.
Agua destilada	85 cc

La suma de las dos soluciones tiene un color rojizo que va aclarándose y haciéndose más amarillo.

Tras 24 horas se le añade 0.3 gramos de carbón activado, se agita un par de minutos y después se filtra.

Ácido periódico            0.5 g.

Agua destilada            100 cc

Baño sulfuroso

Metabisulfito sódico al 10%            6 cc.

Ácido clorhídrico normal            6 cc.

Agua destilada            100 cc.

B) Técnica.

1. Desparafinar en ácido periódico durante 15 minutos.
2. Lavar en agua destilada 5 minutos.
3. Poner reactivo de Schiff 20 minutos.
4. Baño de agua sulfurosa 10 minutos.
5. Lavar en agua corriente durante 10 minutos.
6. Teñir con hematoxilina 20 segundos.
7. Lavar con agua corriente.
8. Deshidratar y montar.

2.2.2.- Técnica de citometría de flujo

2.2.2.1.- Preparación de las suspensiones celulares

Una vez revisadas todas las preparaciones histológicas de cada caso estudiado, seleccionamos aquellas con mayor proporción de parénquima respecto al estroma. A partir de los bloques de parafina realizamos 3-4 secciones de 35

microm que fueron desparafinadas y rehidratadas en soluciones de etanol a concentraciones decrecientes (100°, 95°, 70°, 50°) hasta el agua. A continuación seguimos los siguientes pasos:

- 1) Disgregación mecánica, triturando el tejido hasta formar una "pasta" homogénea.
- 2) Disgregación enzimática en una solución de pepsina al 0.5 % (sigma) en 0.9 % de ClNa a pH 1.5, durante 1 hora en baño de 37° con vortex intermitente cada 5-10 minutos.
- 3) Filtrado a través de una malla de nylon de 45 microm de poro con el fin de eliminar los restos tisulares.
- 4) Centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos.
- 5) Lavado en PBS y nueva centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. Decantar el sobrenadante.
- 6) Tinción del pellet, incubándolo de 4-18 horas en la oscuridad, con una solución que contiene:
  - 50 microgramos/ml de Ioduro de Propidio.
  - 50 microgramos/ml de Tritón X-100 al 0.1 %.
  - 50 microgramos/ml de Buffer Citrato al 0.1 %.
  - 25 microgramos/ml de RNAsa.
  - PBS.

#### 2.2.2.2.- Análisis citofluorométrico

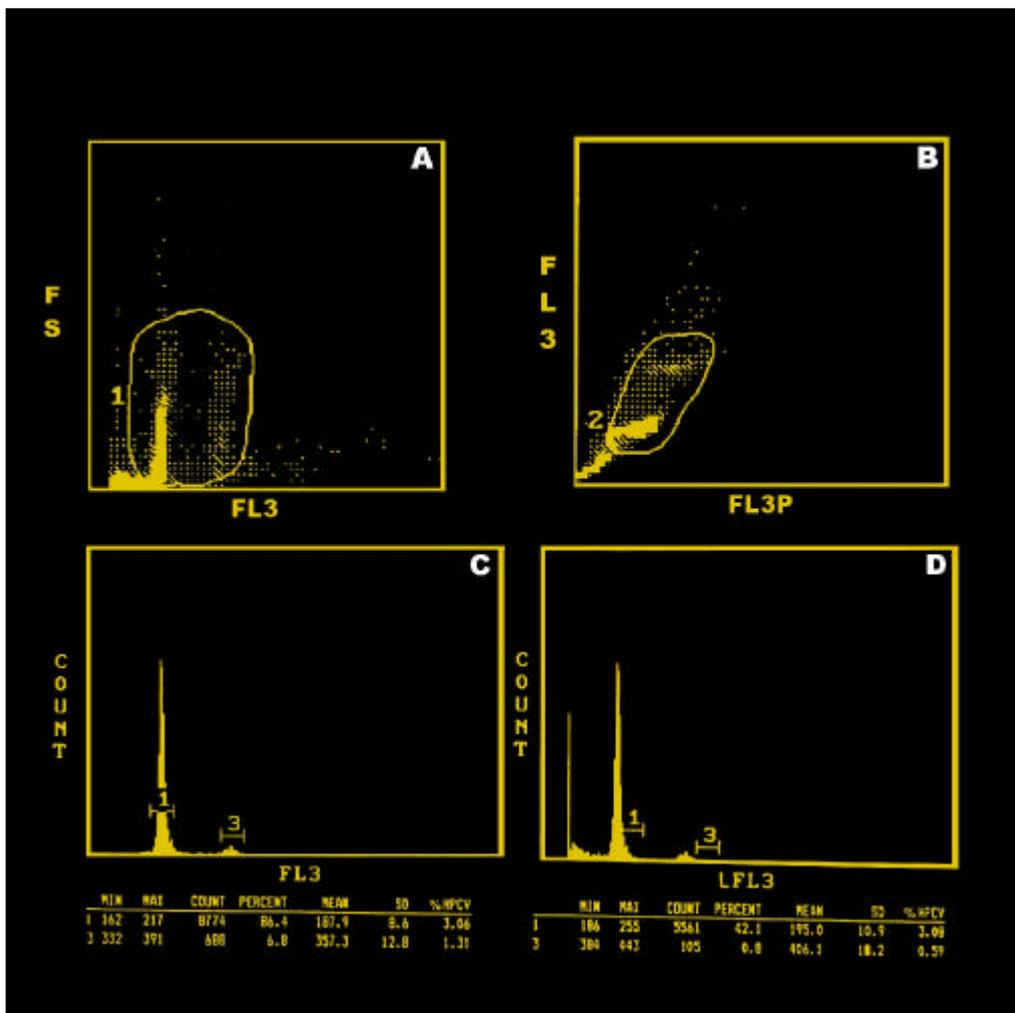
Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo Epics Profile II (Coulter) equipado con un láser de argón refrigerado por aire con una potencia de 15 mW. El test de análisis fue definido de forma que aspirase 75 microlitros de muestra y que ésta atravesara la cámara de flujo a una velocidad de 10 microlitros/minuto, con una presión de envoltente líquido de 7.0 psi. El voltaje de los fotomultiplicadores así como las ganancias fueron reajustadas según las características de cada muestra y

se consideró como satisfactorio un análisis mínimo de 20.000 células en cada una de ellas.

Se generaron 4 histogramas a partir de cada muestra como refleja la fig. 4. En el primero de ellos (histograma A) representamos el tamaño del núcleo (FS) y la intensidad de la emisión de fluorescencia 3 (FL3), reflejo del contenido de ADN. Dibujamos, entonces, el bitmap 1 con el fin de acortar el ciclo celular.

En el histograma B representamos la FL3 y la fluorescencia de pico (FL3P) con el fin de separar lo que son realmente núcleos con mayor contenido en ADN de los "dobletes", es decir, 2 núcleos de contenido 2 c cada uno de ellos, pero que atraviesan simultáneamente el haz de láser siendo interpretados como uno solo de contenido 4c. Para ello dibujamos un 2º bitmap, considerando como dobletes aquellos núcleos por debajo de la diagonal.

Figura 4



Tanto en el bitmap 1 como en el 2 no excluimos totalmente los detritus porque al tratarse de tumores parafinados es aconsejable recogerlos para un adecuado análisis matemático del ciclo celular.

El histograma C representa el contenido en ADN del tumor y es el que emplearemos posteriormente para analizar la proporción de células en cada una de las fases del ciclo. En él se encuentran activados los dos bitmap, es decir, que analiza únicamente los eventos que hemos considerado dentro del ciclo, desechando además los dobletes. El histograma D es similar al anterior pero en escala logarítmica y sin activar los bitmap y se diseñó con el fin de comprobar que no se "escapaba" ningún pico anormal en C.

### 2.2.3.- Interpretación de los histogramas

Se consideraron válidos únicamente aquellos histogramas en los que el coeficiente de variación del pico G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> era inferior a 7.

Consideramos como aneuploides los histogramas en los que se reconocían claramente 2 picos G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> o aquellos en los que el supuesto pico G<sub>2</sub>-M contenía más del 20% de los eventos recogidos en el histograma. Clasificamos el grado de ploidía del tumor de acuerdo a su índice de ADN, considerando como tal la relación entre el contenido en ADN de la muestra a estudio y el de una población de referencia, en nuestro estudio linfocitos de amígdala humana. Pueden establecerse varios grupos cuyos histogramas ya fueron reflejados en la fig. 3:

- I ADN = 1                      Diploide (2n)
- I ADN > 1                    Aneuploide
  - \* 1.9-2.1 tetraploide (4n)
  - \* > 2.1 multiploide

Los datos generados por el citómetro fueron transferidos a un ordenador personal y se analizaron mediante el Software Cytology (Coulter) con objeto de determinar la proporción de células en cada una de las fases del ciclo. En los casos

en que existían claramente 2 poblaciones celulares ciclando, empleamos un método diseñado específicamente para ello, en el resto usamos el método "Multiple-broadened rectangles" basado en el modelo de Bagwell en el que la fase S es calculada empleando curvas Gaussianas.

En ambos casos se empleó un algoritmo de sustracción de background para compensar el efecto de los núcleos fragmentados durante el proceso de preparación de la muestra. Clasificamos a los tumores en:

- baja actividad proliferativa: fase S < 10%
- alta actividad proliferativa: fase S > 10%

#### 2.2.4.- Estudio inmunohistoquímico

##### 2.2.4.1.- Técnica inmunohistoquímica

De material incluido en parafina y previamente fijado en formalina (dilución 1:10 de formaldehído comercial al 37 %), se han obtenido cortes, en los que se ha estudiado la presencia del anticuerpo anti-proteína p53 (NOVACAstra LTD) mediante técnica inmunohistoquímica, aplicando el método peroxidasa-antiperoxidasa. La técnica aplicada fue la siguiente:

1. Cortes de 5 micras en portas gelatinados
2. 60 minutos en horno a 55 °C
3. Desparafinar (xilol)
4. Deshidratar (series de etanol)
5. PBS durante 5 minutos
6. Bloqueante de unión inespecífica durante 1.5 min
7. Anticuerpo primario: p53 (1:50)
8. Toda la noche en cámara húmeda
9. Lavar con PBS durante 15 minutos

10. Anticuerpo secundario durante 1 hora
11. Lavar con PBS durante 15 minutos
12. Complejo peroxidasa-antiperoxidasa durante 1 hora
13. Lavar con PBS durante 15 minutos
14. Sustrato cromógeno DAB (diaminobenzidina) 8 minutos
15. Lavar con agua destilada durante 15 minutos
16. Contrateñido con Hematoxilina de Mayer durante 3 min
17. Lavar con agua e hidratar
18. Montar

#### 2.2.4.2.- Método inmunohistoquímico.

Siguiendo los criterios de Kallakury y cols. (1994)<sup>235</sup> encontramos patrones distintos de inmunotinción nuclear: nuclear difuso, nuclear regional y nuclear focal.

La tinción débil o equívoca de p53, así como la tinción aislada de núcleos se consideraron casos negativos (figs. 21 y 22). Se consideró expresión positiva de la proteína p53, sólo para aquellos casos que mostraban intensa tinción nuclear (figs. 23 y 24).

#### 2.2.5.- Datos de microscopia óptica convencional

##### 2.2.5.1.- Grado de diferenciación histológica

Fue seguido el método de gradación de VACURG (Veterans Administration Cooperative Urologic Research Group) o índice sumatorio de Gleason, que considera la capacidad de formación glandular del tumor y su delimitación con el tejido prostático no afectado. Establece 5 patrones, pero dada la mezcla de patrones en el carcinoma, se asigna un dígito al patrón principal (de 1 a 5) y se le suma el segundo patrón predominante (también de 1 a 5), con lo que se establece una puntuación o índice sumatorio de 2 a 10. De presentarse en patrón único o puro, se multiplica el

índice sumatorio por 2. También hay solución para los casos en que se presentan más de 3 patrones (ver esquema).

Los patrones o grados microscópicos de Gleason (VACURG) son los siguientes:

- Grado 1: Microglándulas uniformemente redondas, de disposición compacta, congregadas en un área de límites definidos y que comprimen el tejido vecino o adyacente (fig. 5).
- Grado 2: Glándulas algo más irregulares y separadas por más cantidad de estroma (separación menor o igual al diámetro de las glándulas neoplásicas) (fig. 6).
- Grado 3 (fig. 7): Se subdivide en tres tipos (a,b y c).
- El subtipo 3a. Comprende glándulas con mayor variación de tamaño y forma, y con amplia separación entre ellas por estroma (mayor del diámetro de una glándula).
- El subtipo 3b. Al patrón anterior se suman glándulas minúsculas o diminutos agregados celulares.
- El subtipo 3c. Masas redondas y circunscritas de células tumorales con patrón cribiforme o papilar.
- Grado 4.- Se subdivide en dos subtipos:
- Subtipo 4a: patrón tumoral de glándulas fusionadas con áreas de límites infiltrantes o "desgarrados" (fig. 8).
- Subtipo 4b: como el patrón anterior con células claras "patrón hipernefroide" (fig.9).
- Grado 5. Es la forma más indiferenciada que incluye variante comedocarcinomatosa (masas sólidas o cribiformes con necrosis central) (fig.10) y patrón sólido cordonal (fig.11).

Figura 5

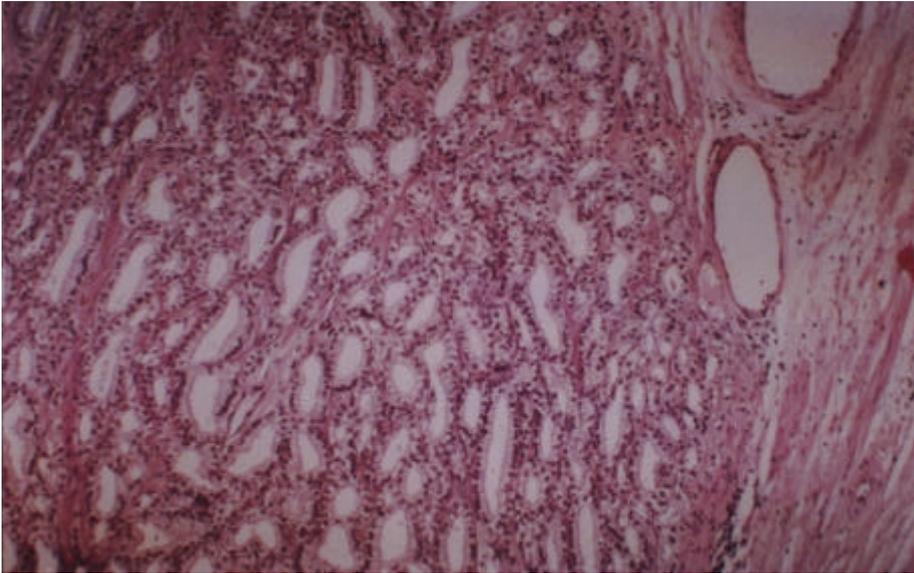


Figura 6

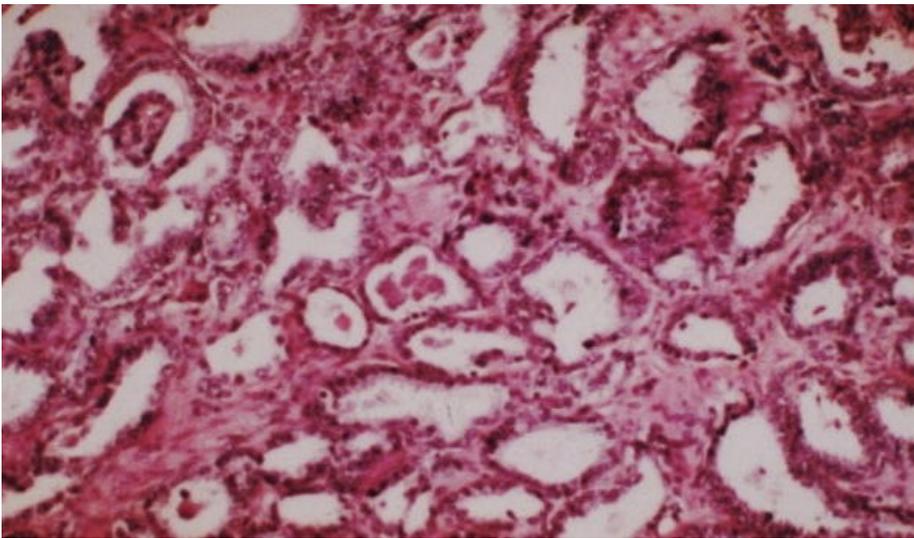


Figura 7

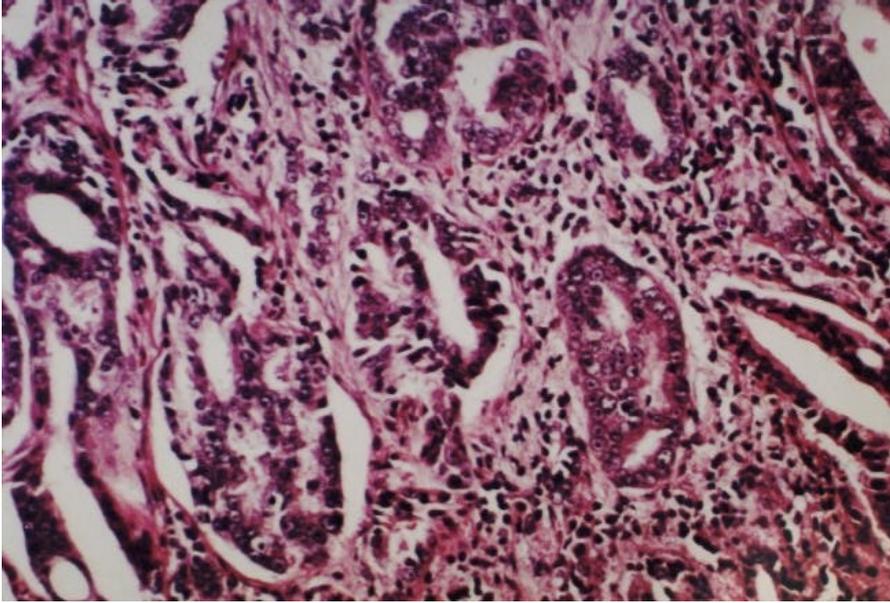


Figura 8

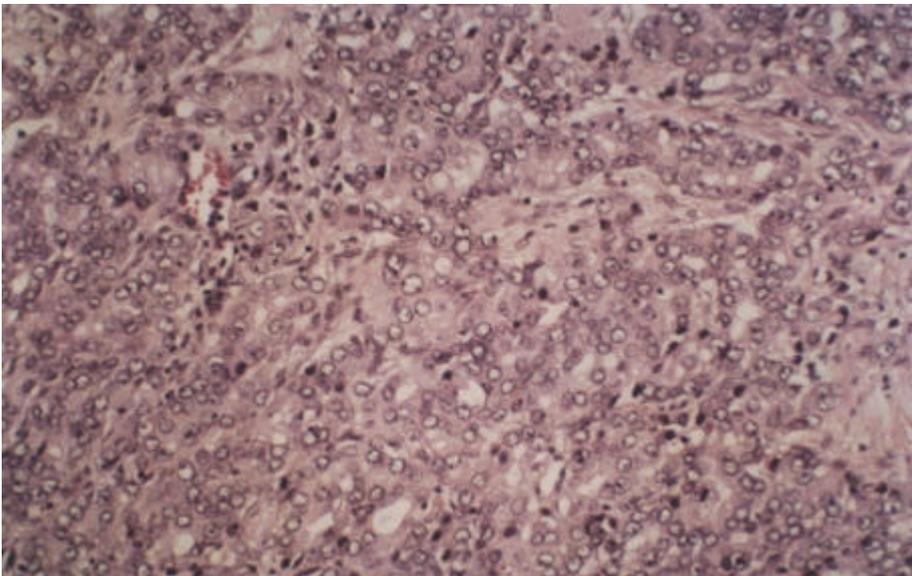


Figura 9

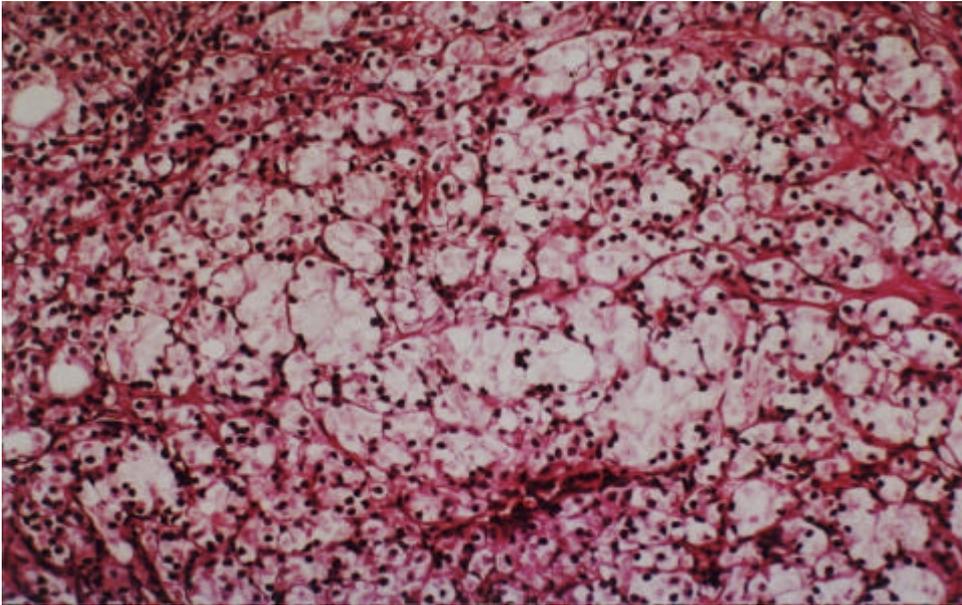


Figura 10

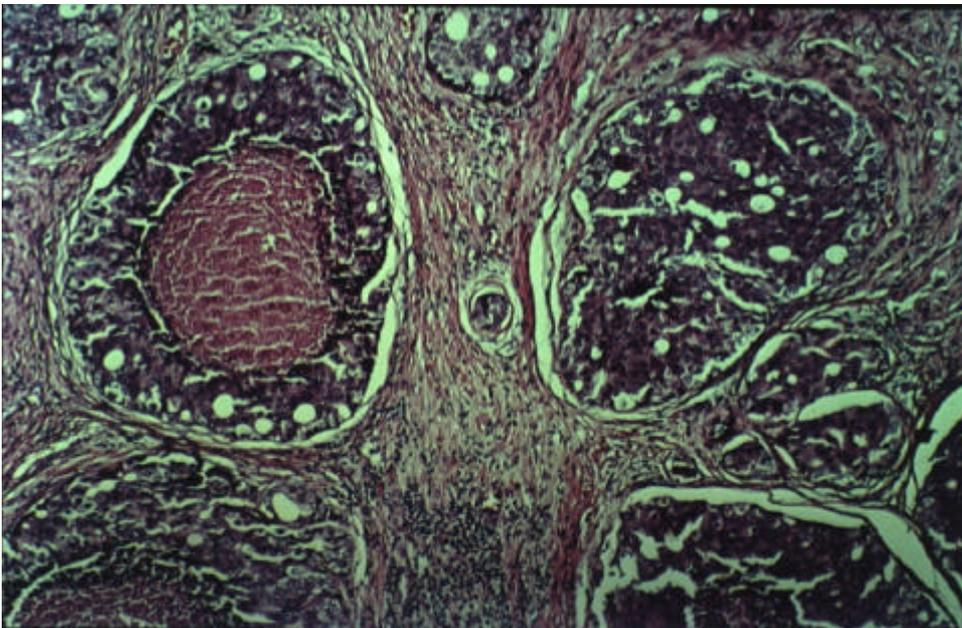
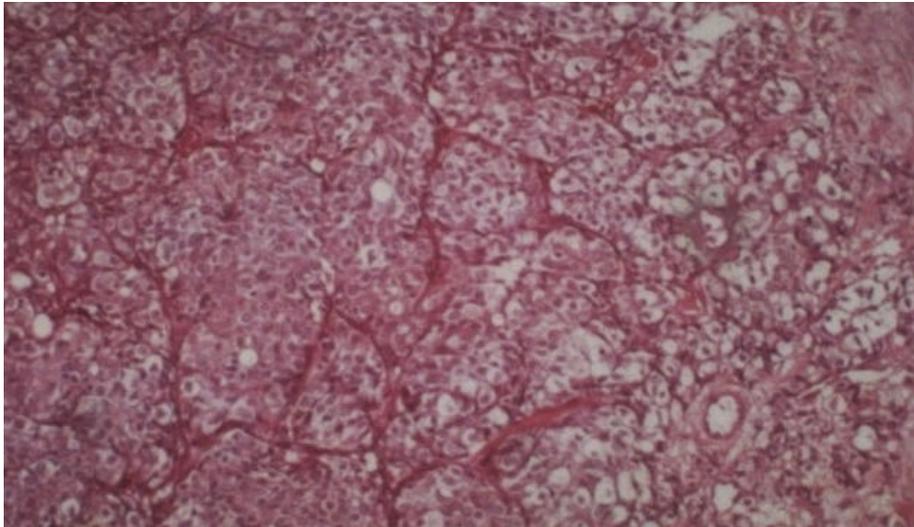


Figura 11



#### 2.2.5.2. Grado de anaplasia nuclear

Basándonos en los criterios de la O.M.S., dictaminados por Mostofi y Cols en 1980, se consideran tres grados, atendiendo preferentemente a la atipia nuclear, que viene definida por variación en el tamaño, forma y cromatismo de los núcleos, así como por el carácter de los nucléolos:

- Grado 1 - Las células ofrecen núcleos relativamente pequeños, uniformes y de cromatina laxa con nucléolos no excesivamente significativos (fig. 12).
- Grado 2 - Las células poseen algunas variaciones en el tamaño nuclear, la cromatina se hace más agranular y los nucléolos son evidentes (fig. 13).
- Grado 3 - Las células tumorales tienen considerables variaciones en el tamaño y cromatismo nuclear con incluso fenómenos de multinucleación y presencia de uno o varios macronúcleolos (fig. 14).

La clasificación de Mostofi considera también el grado de diferenciación glandular, de modo que los carcinomas bien diferenciados con glándulas simples y pequeñas o papilas, coinciden con el grado 1, los moderadamente diferenciados con las glándulas cribiformes o fusionadas con un grado 2; y por último, los poco diferenciados, con nula o escasa formación de glándulas, correspondiendo con el grado 3.

Figura 12

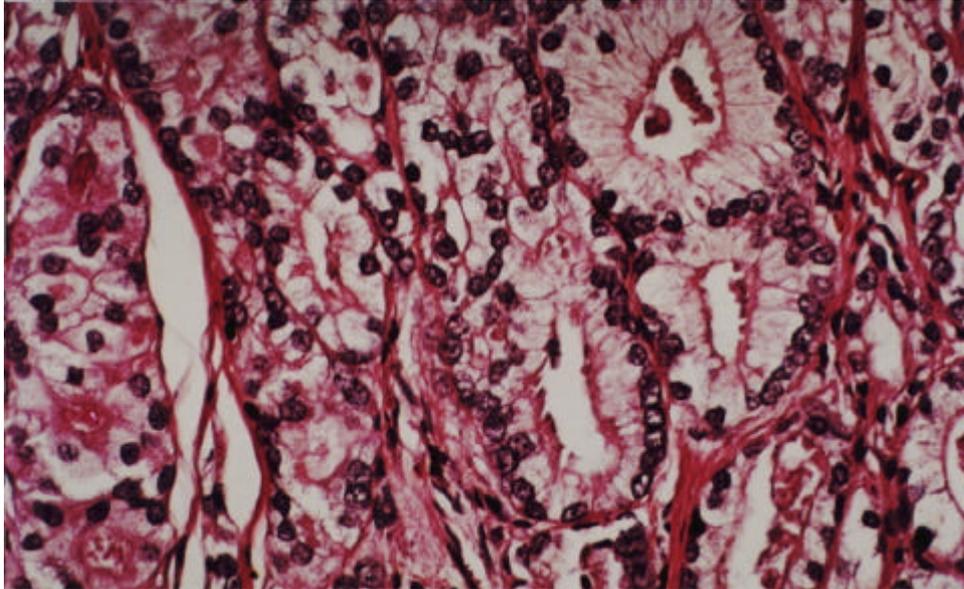


Figura 13

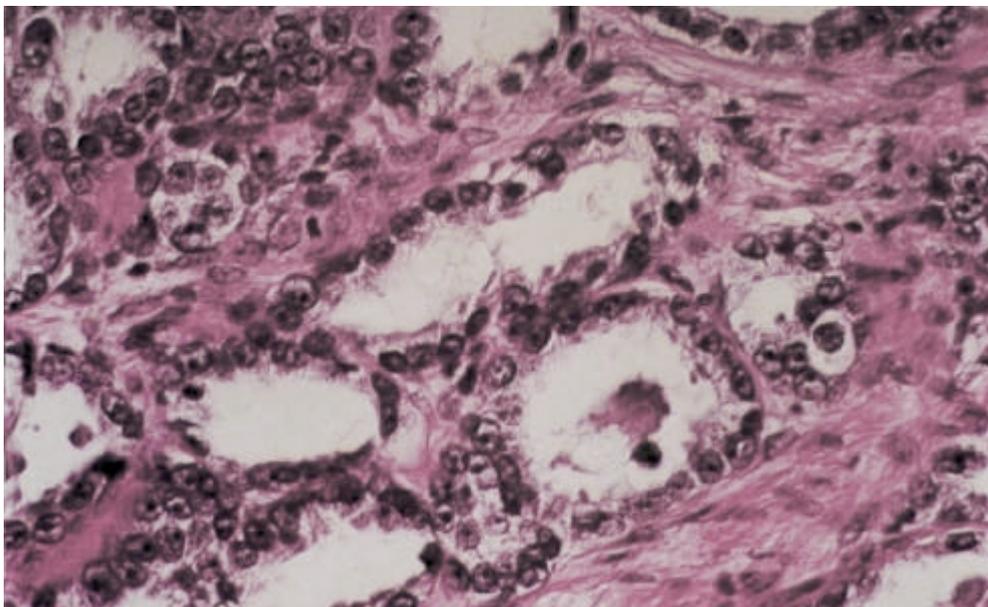
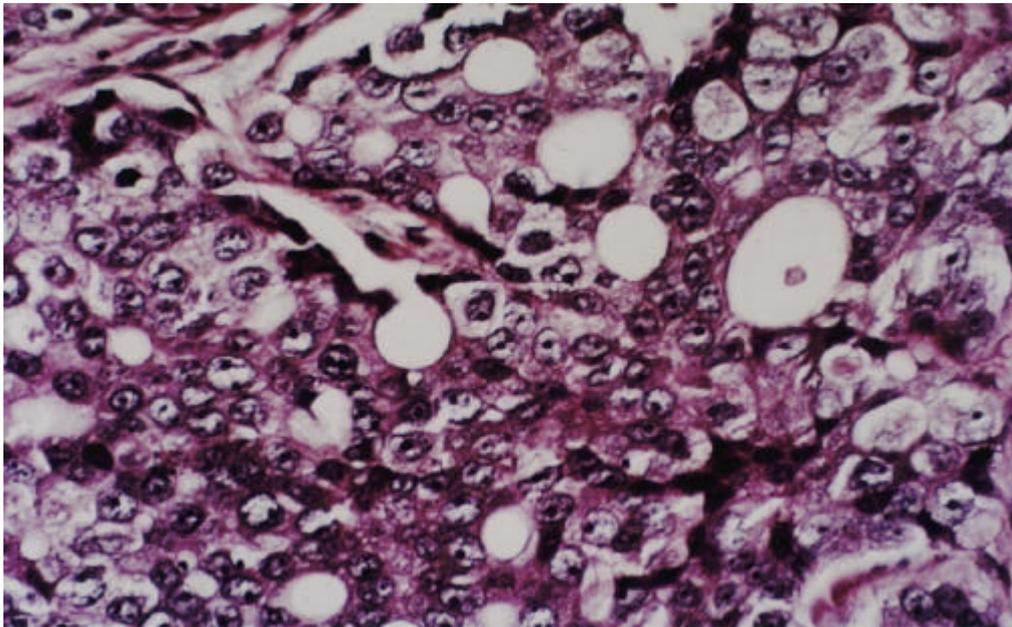


Figura 14



### 2.2.5.3 Necrosis

Se consideran casos que presentan necrosis tumoral de distribución difusa o focal, adoptando patrón comedocarcinomatoso (figs. 15 y 16).

Figura 15

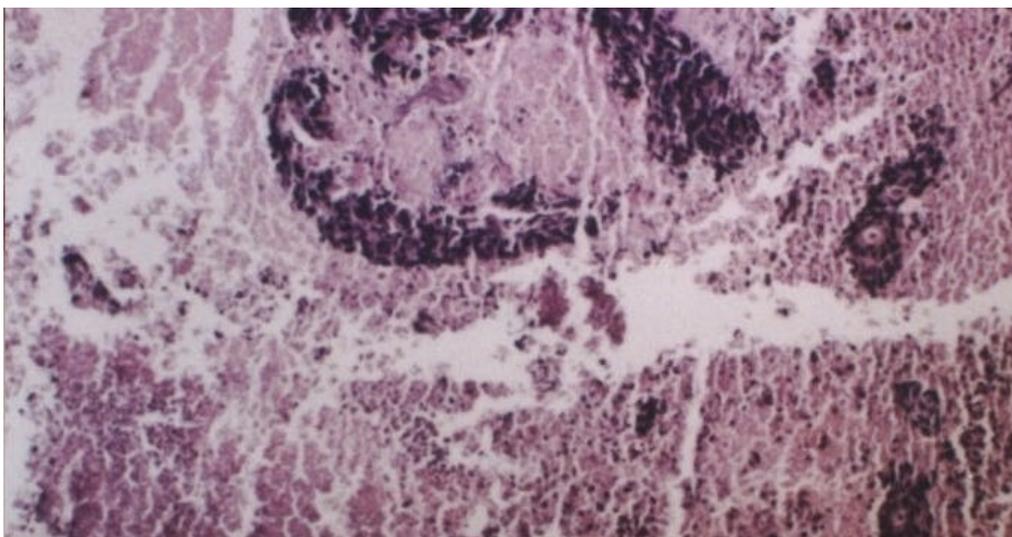
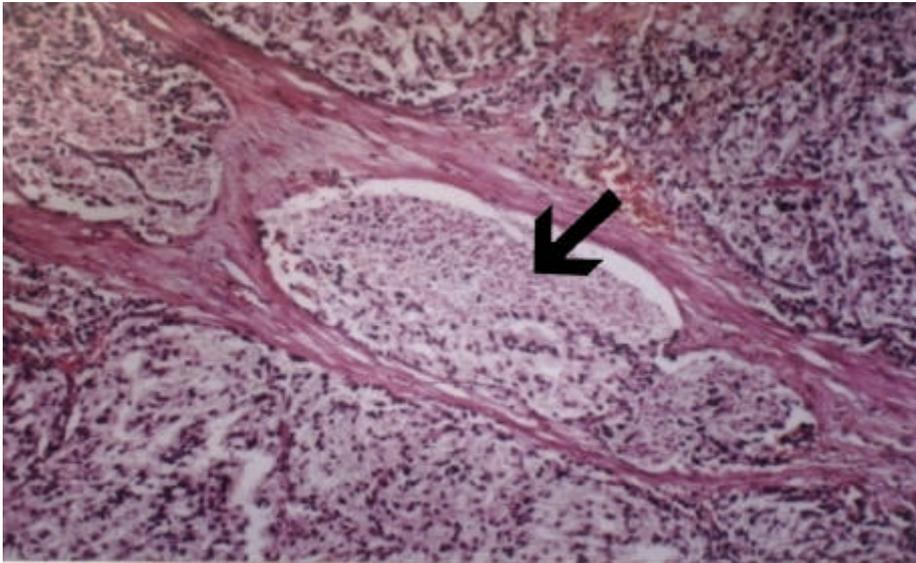


Figura 16



#### 2.2.5.4 Respuesta inflamatoria del estroma

Se valora el infiltrado inflamatorio mononuclear del estroma tumoral, considerando un grupo en el que la respuesta es nula o escasa, y otro con respuesta inflamatoria evidente (fig. 17).

#### 2.2.5.5 Invasión perineural

Se considera la invasión tumoral de espacios perineurales en el material de biopsia remitido, independientemente de que se trate de un cilindro tisular, muestra de resección transuretral o pieza de prostatectomía (fig. 18).

#### 2.2.5.6 Invasión capsular prostática

Se señalan aquellos casos en los que es posible demostrar infiltración neoplásica de la cápsula prostática (fig. 19).

### 2.2.5.7 Extensión a las vesículas seminales

Entre los datos de microscopía óptica convencional se considera también la invasión tumoral de las vesículas seminales (fig. 20).

Figura 17

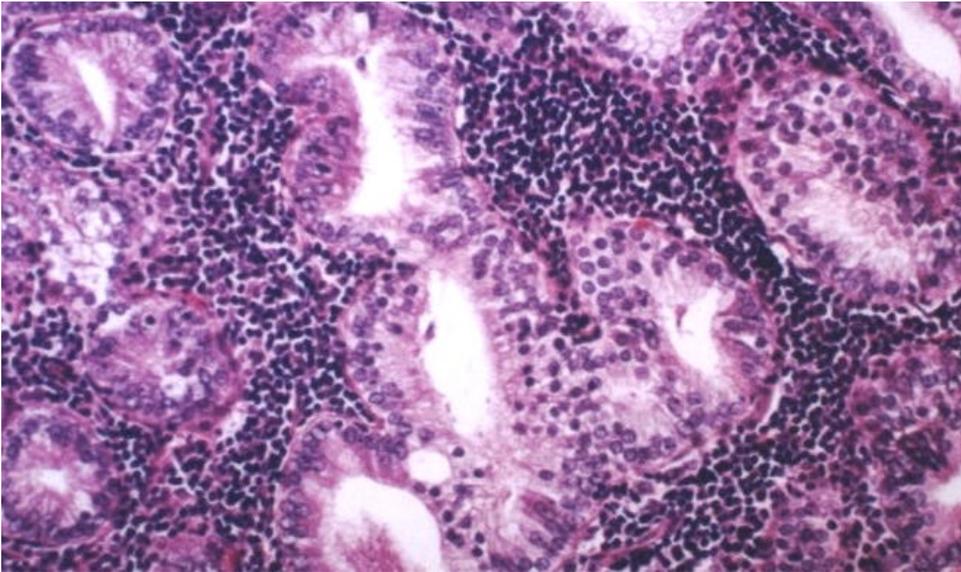


Figura 18

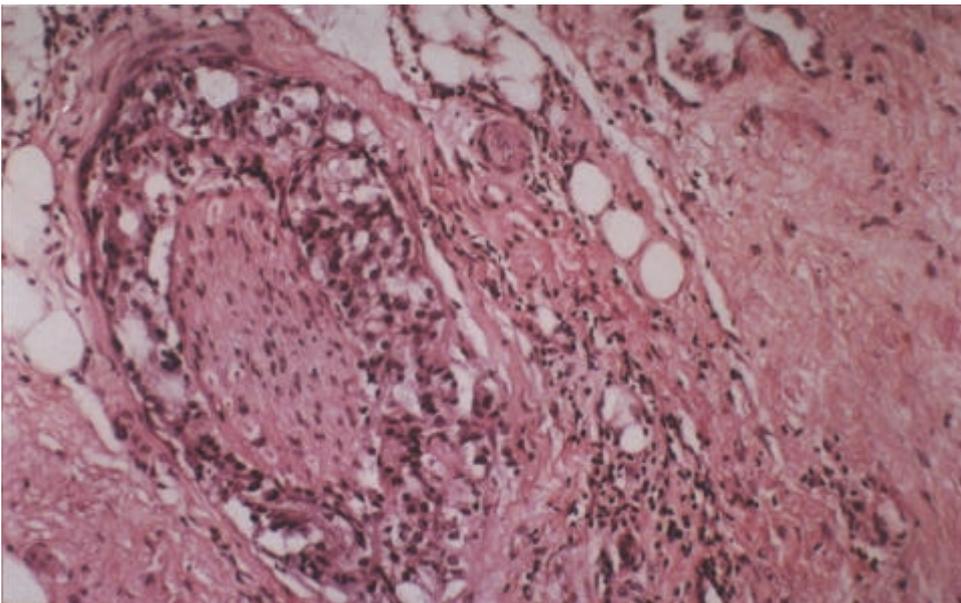


Figura 19

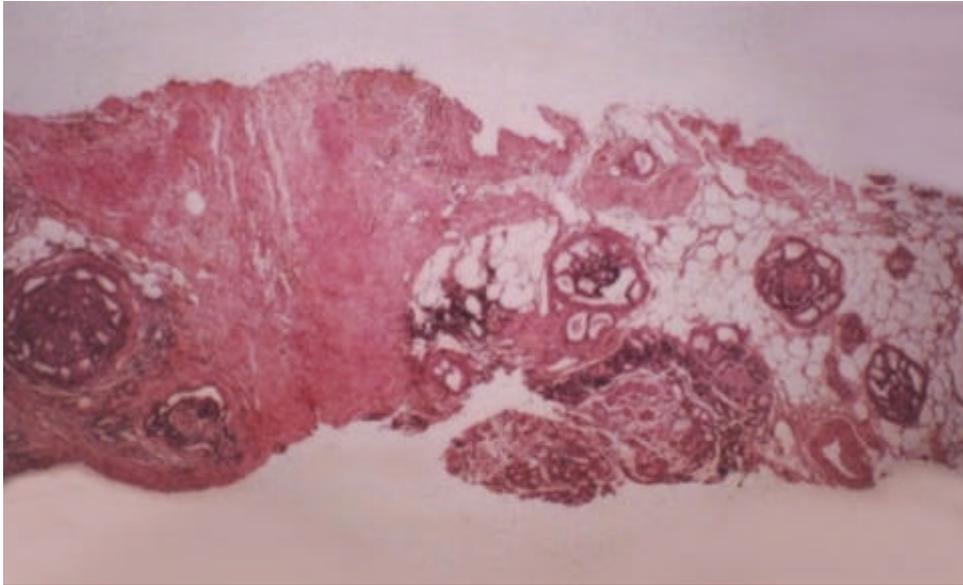


Figura 20

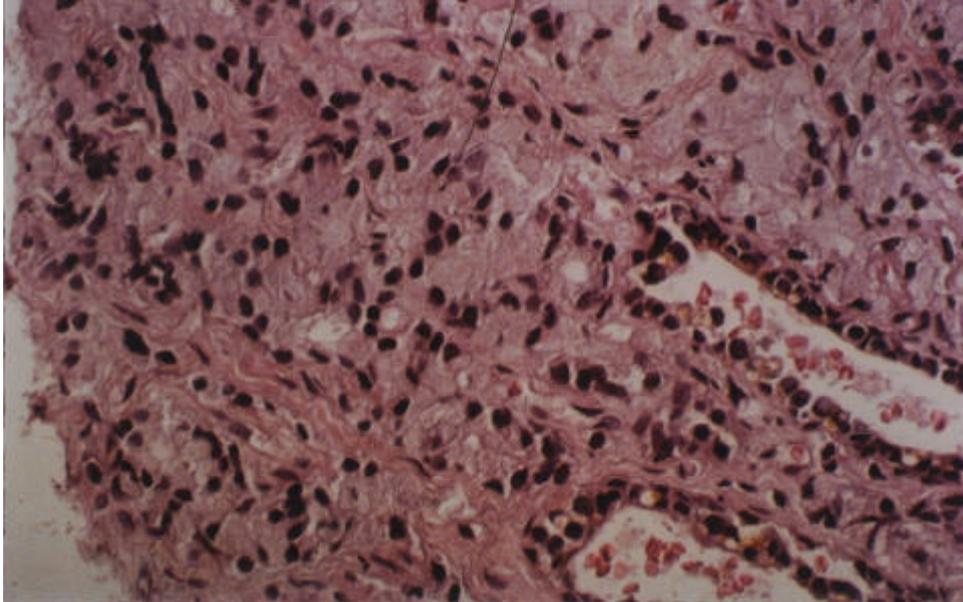


Figura 21

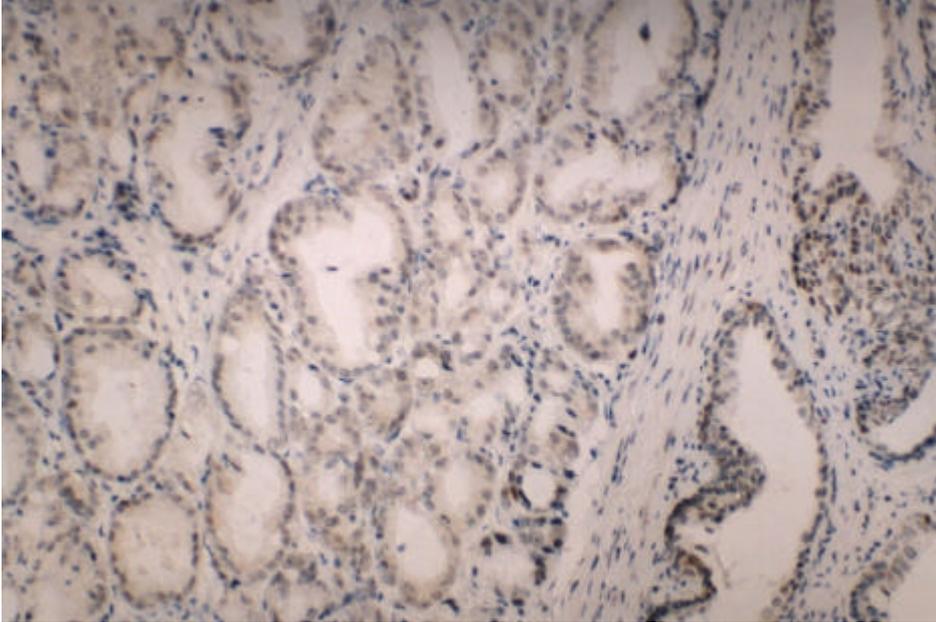


Figura 22

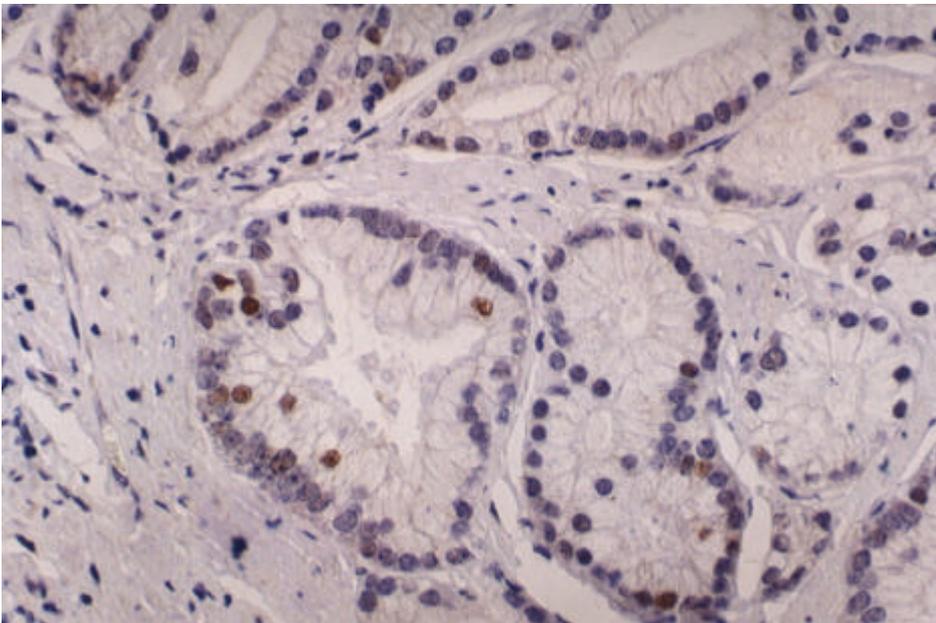


Figura 23

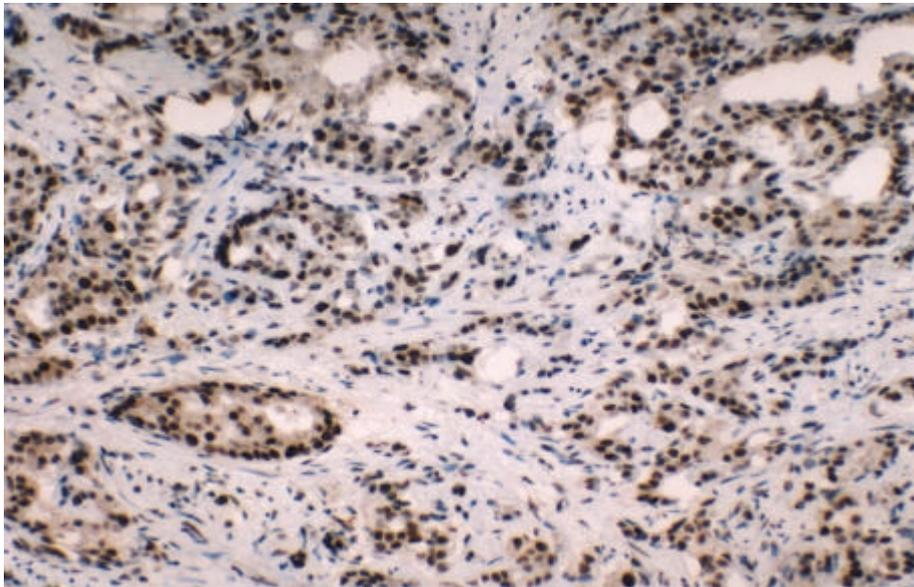
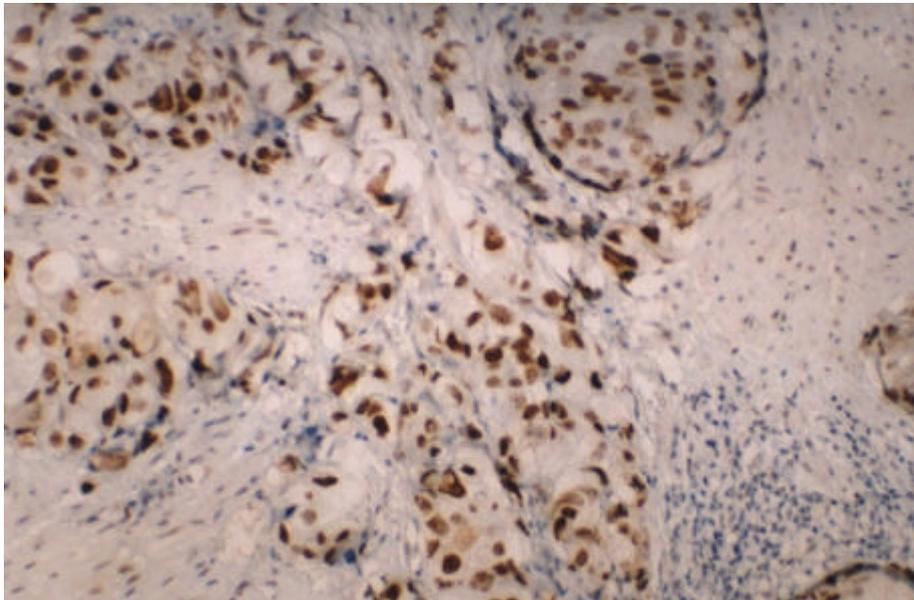


Figura 24



### 2.2.6.-Datos de citometría de flujo

Se estudia la ploidía tumoral e índice proliferativo o tanto por ciento de células en fase S ( fase de síntesis ). Datos que se correlacionan con los parámetros morfológicos de grado de diferenciación histológica (Gleason) y grado de anaplasia nuclear (Mostofi).

### 2.3.- MÉTODO DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Una vez concluida la recogida de datos, estos se introdujeron en una base de datos y fueron procesados con el programa R-Sigma de Horus Hardware ( Madrid, 1990 ).

Los resultados se expresaron como media estadística  $\pm$  desviación estándar de la media, considerando que eran estadísticamente significativos cuando  $p < 0.05$ .

Para la comparación de variables cuantitativas utilizamos el test t de Student o la prueba U de Mann-Whitney cuando las varianzas no eran homogéneas.

Para establecer la correlación entre variables numéricas empleamos el parámetro denominado coeficiente de correlación.

La comparación de variables cualitativas la realizamos utilizando el test del chi cuadrado. La comparación de este tipo de variables en tablas de contingencia de 2x2, cuando el efectivo de la muestra era pequeño, fue realizado mediante la prueba exacta de Fisher.

Para la comparación entre variables cualitativas con categorías ordenadas utilizamos el Método de Ridit.

Para el análisis de la supervivencia empleamos curvas actuariales de Kaplan-Meier llevándose a cabo comparaciones de la función de supervivencia mediante la utilización del "LOG-RANK TEST" para la comparación de curvas de supervivencia.

Para determinar la influencia de cada variable significativa en el análisis univariado, en relación a la variable éxitus empleamos el método de Regresión logística.

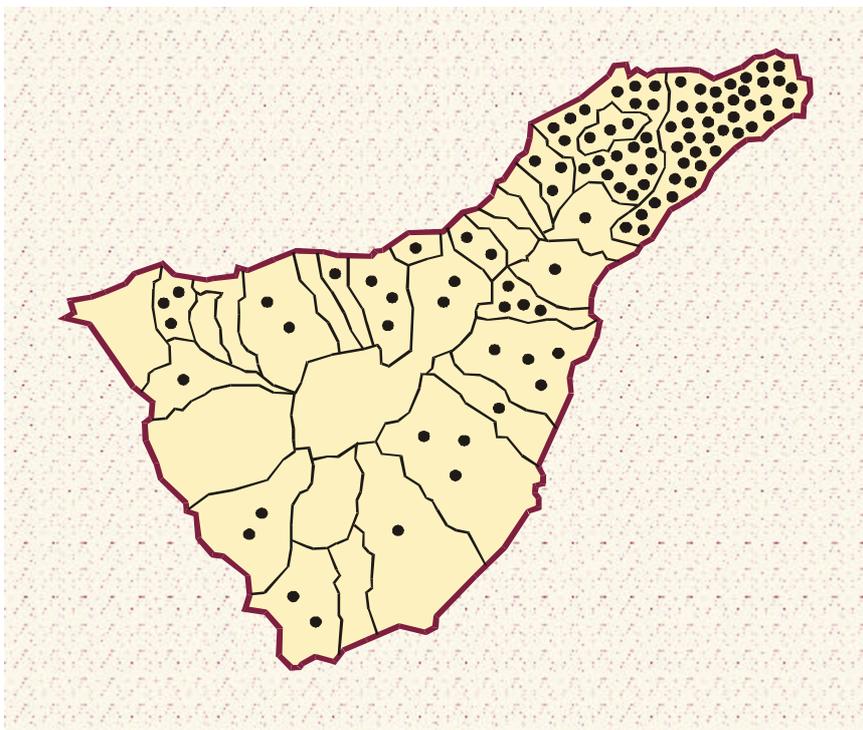
## 4.- RESULTADOS

Realizado el estudio retrospectivo de los 108 pacientes con diagnóstico de Carcinoma de Próstata, hemos valorado el significado pronóstico de diversos factores clínicos y patológicos, relacionándolos con la supervivencia.

#### 4.1.- RESULTADOS CLÍNICOS

Los pacientes han sido en su totalidad diagnosticados y tratados en el Hospital Universitario de Canarias (HUC), siendo la distribución demográfica de los mismos la reflejada en la fig. 25.

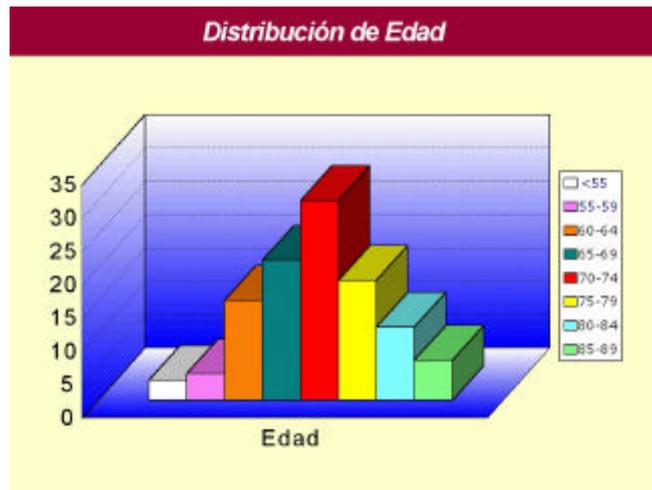
Figura 25



La mayoría (101) residían en la isla de Tenerife, 5 en La Palma y 2 en La Gomera. Un gran número de pacientes procedían del medio urbano, y el resto de núcleos de población rural. Estos datos pueden estar determinados por varios factores como por ejemplo el número de habitantes por municipio o las diferentes áreas geográficas que el HUC asistía durante el periodo de estudio.

La distribución por grupos de edad se representa en la fig. 26. La mayoría de los pacientes están entre la sexta y séptima décadas con un pico entre los 70 y 74 años. La edad media de los pacientes globalmente considerados en el momento de la primera consulta era de 69.75 con una desviación típica de 12.5.

Figura 26



El estado civil pudo ser determinado en 92 pacientes, siendo 80 casados, 3 solteros y 9 viudos. Los datos referentes a la profesión no muestran hallazgos dignos a destacar, de forma que, en nuestro estudio, la profesión no tiene carácter determinante.

En relación al motivo de la primera consulta, 64 pacientes acudieron por prostatismo, 27 por retención urinaria aguda (RAO), 8 por hematuria y 4 por dolor óseo. Los 5 pacientes restantes consultaron por otros problemas urológicos (fig. 27).

Figura 27



Relativamente a la descripción de resultados de la exploración física y exámenes complementarios solicitados en la primera consulta destacamos los siguientes hallazgos:

- El tacto rectal se encontró recogido en 98 del total de las historias clínicas. En éstas, 50 pacientes presentaban consistencia "leñosa o pétrea" de la próstata al examen rectal; 20 tenían algún nódulo prostático (6 un nódulo grande, 6 un nódulo mediano y 8 un nódulo pequeño), y 18 aspecto multinodular; en los 10 pacientes restantes sólo encontramos registrado aumento del volumen prostático. El examen rectal fue doloroso en 17 pacientes no habiendo referencia de dolor en 81. En relación al volumen prostático, registrado en las historias en forma de cruces, éste fue grande en 34 casos, mediano en 24 y pequeño en 40. En 66 pacientes la delimitación de la glándula prostática era buena frente a 32 en los que fue difícil precisar sus límites. Se encontró buena movilidad al tacto en 95 de los casos en comparación a 3 en los que ésta fue mala.

- El valor medio del hematocrito, globalmente considerado, fue de 40.1 con una desviación estándar de 9.2.

- Respecto a la hemoglobina, su valor medio fue de 13.5 con una desviación típica de 1.9.

- La velocidad de sedimentación globular mostró un valor medio de 32.2 y una desviación típica de 31.2.

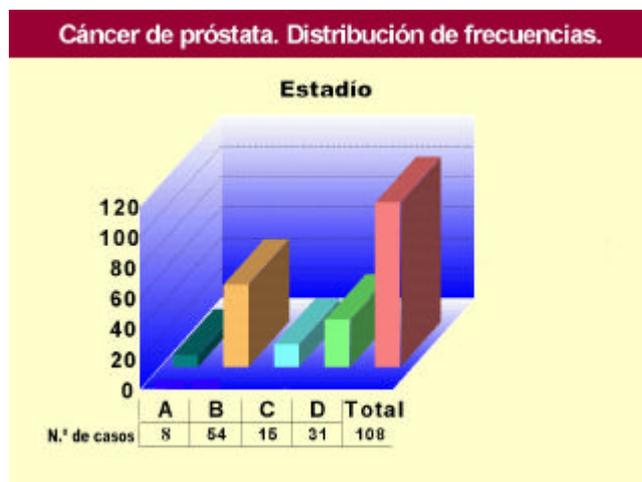
- El valor medio del nitrógeno ureico en sangre (BUN) fue de 21.3 con una desviación estándar de 7.5 y el de la creatinina fue de 1.1 con una desviación de 1.5.

- La fosfatasa alcalina presentó un valor medio de 178.3 siendo la desviación típica de 98.7; el valor medio de fosfatasa ácida prostática fue de 8.5 y la desviación de 23.5.
- El antígeno prostático específico (PSA) sólo se encontró registrado en 19 de los pacientes, por eso, en nuestro estudio, los resultados obtenidos del análisis de esta variable carecen de carácter determinante.
- En 87 pacientes se realizó urinocultivo que reveló infección del tracto urinario en 25, frente a 62 casos en los que ésta fue negativa.
- La ecografía prostática se solicitó en 47 casos siendo sus resultados sugestivos de cáncer de próstata en 35 casos, fue negativa en 2 , y dudosa en 10.
- La tomografía axial computarizada pélvica (TAC) sólo fue requerida en 15 casos del total de la muestra, por lo que en nuestro estudio, no puede ser analizada como factor pronóstico.
- En 62 casos se realizó urografía endovenosa revelando "hongo prostático" en 22, "vejiga de lucha" en 19 y uropatía obstructiva en 16; fue normal en 5 casos.
- La gammagrafía ósea fue realizada en 104 pacientes mostrando metástasis óseas en 30 casos, frente a los 74 en que sus resultados fueron negativos para invasión metastásica.
- De los 77 pacientes a los que se pidió radiografía de tórax, 7 mostraron invasión metastásica frente a los 70 en los que ésta fue negativa.

- La gammagrafía hepática se encontró registrada en 88 casos siendo positiva para invasión metastásica en 8 y negativa en 80. En 20 casos fue solicitada ecografía como examen auxiliar en la detección de metástasis hepáticas; esta prueba aportó resultados que demostraron este hecho en 3 casos.

Respecto a la extensión tumoral (estadio), 8 pacientes se encontraban en estadio A en el momento del diagnóstico, 54 en estadio B, 15 en estadio C y 31 en estadio D (fig. 28).

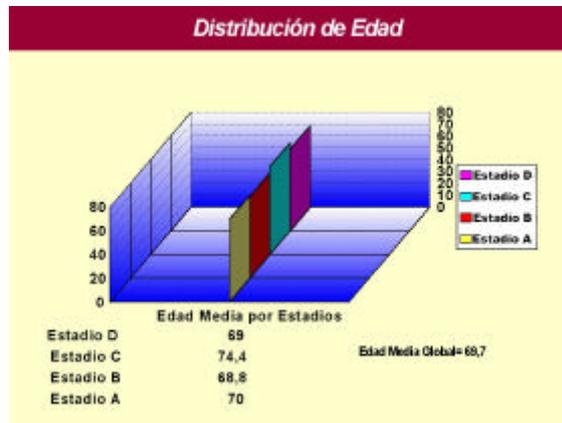
Figura 28



Del total de pacientes, 98 fueron tratados de forma variable con tratamiento hormonal (agonistas de la LHRH, dietilestilbestrol, flutamida u orquiectomía); en 12 fue realizada prostatectomía radical, en 6 quimioterapia y en 8 radioterapia con fines curativos.

Al analizar la edad media de los pacientes en los diferentes estadios clínico-patológicos obtuvimos la distribución de frecuencias reflejada en la figura 29.

Figura 29



Al correlacionar tacto rectal y estadios, observamos significación estadística en el sentido de que en estadios más avanzados, el examen fue más indicativo de tumoración maligna. Así, estadios más bajos, se asociaron más frecuentemente con hiperplasia o nódulo pequeño mientras que los estadios más avanzados con tumoración de consistencia más pétrea.

Cuando analizamos la relación entre el dolor y los diferentes patrones del tacto rectal encontramos significación estadística, en el sentido de que los pacientes que manifestaron dolor al tacto fueron aquellos cuyo examen rectal era más indicativo de cáncer de próstata.

Aunque se evidenció aumento del volumen prostático en todos los estadios, éste fue más importante en estadios más bajos; en estadios más altos fue más frecuente la consistencia pétrea.

No se encontró significación estadística al relacionar movilidad prostática en el tacto rectal y estadios.

Cuando comparamos los hallazgos del examen rectal con la supervivencia de los pacientes, observamos que a más alteraciones en el tacto rectal ( dolor, consistencia pétreo ...) mayor mortalidad; sin embargo, estos resultados no fueron estadísticamente significativos. Cuando analizamos el volumen prostático, recogido en la historia clínica en forma de cruces, no observamos diferencias en relación a la mortalidad. Tampoco encontramos significación en relación a la movilidad y mortalidad.

Los hallazgos referentes al tacto rectal deben ser interpretados con cautela, pues al ser datos recogidos retrospectivamente de las historias clínicas, estos pueden estar influenciados por la sugestividad de los distintos examinadores.

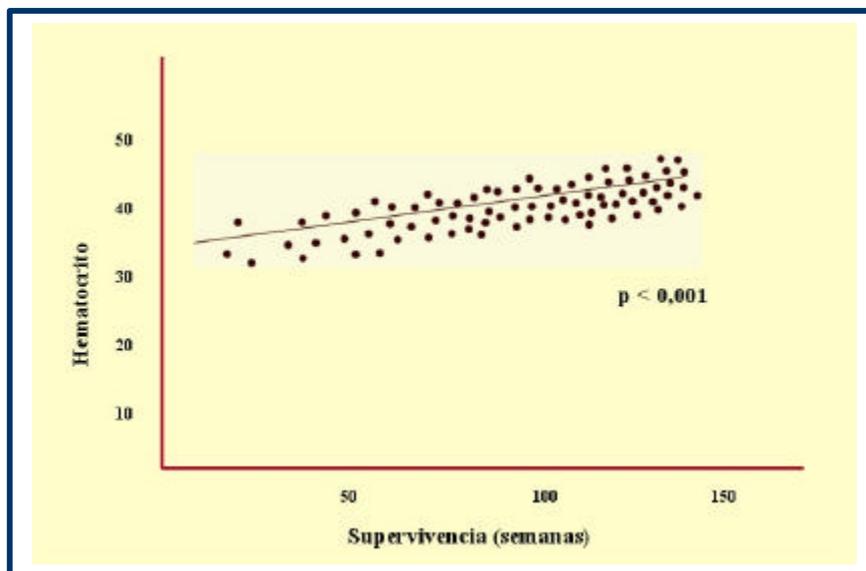
Al analizar el valor del hematocrito en los diferentes estadios, observamos que en el estadio A su valor medio era de 43 con una desviación típica de 5.8; en el estadio B era de 41.3 con una desviación de 4.7; en el estadio C de 40.5 con una desviación de 5.8 y en el estadio D de 36.9 con una desviación de 5.7.

No se encontró significación estadística al comparar el valor del hematocrito con los estadios clínicos ni considerándolos globalmente ni cuando fue comparado de forma independiente con los estadios A, B y C. Sin embargo, encontramos significación estadística, cuando comparamos el valor del hematocrito de cada uno de estos estadios con el estadio D.

La correlación del hematocrito con la presencia de metástasis, óseas o hepáticas, fue estadísticamente significativa.

No se demostró significación en la correlación del hematocrito con los índices sumatorios (VACURG-Gleason) considerados globalmente. Sí se observó significación estadística al correlacionar el hematocrito con la supervivencia ( fig.30 ).

Figura 30

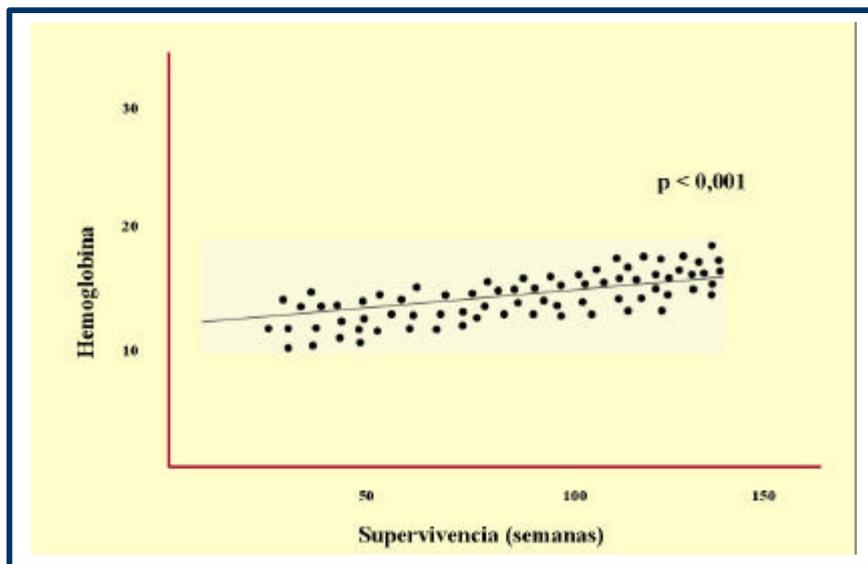


Al relacionar el hematocrito con la supervivencia observamos que éste era un factor pronóstico importante en el sentido de que a menor valor de hematocrito menor supervivencia tal y como se demuestra en la ecuación de regresión lineal de la fig. 30.

Al analizar el valor medio de la hemoglobina en cada estadio observamos que en el estadio A éste fue de 14.8 con una desviación típica de 1.8; en el estadio B fue de 14 con una desviación de 1.7; en el estadio C de 13.7 con una desviación de 1.8 y en el estadio D de 12.35 con una desviación de 2.

Cuando se relacionó los valores de hemoglobina con la supervivencia de los pacientes se observaron diferencias estadísticamente significativas, de tal forma que los pacientes con hemoglobina más baja presentaron peor supervivencia ( fig. 31).

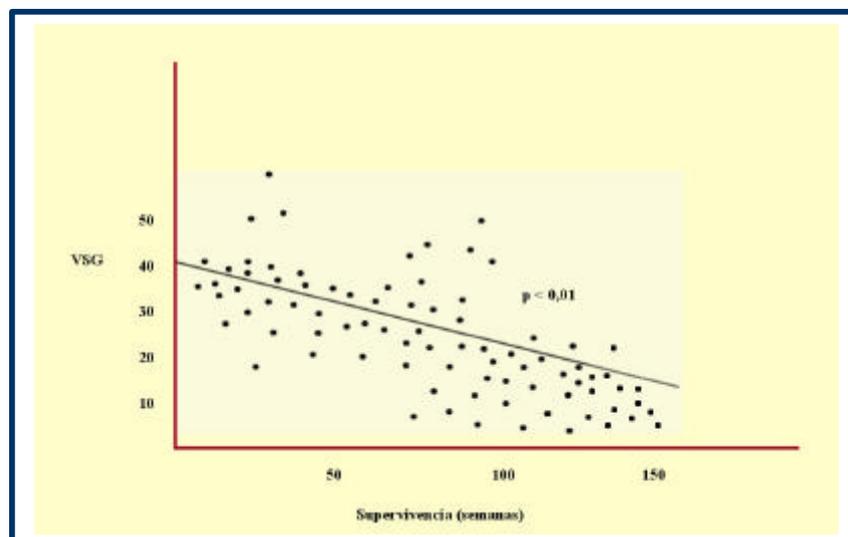
Figura 31



En el análisis de la VSG en los diferentes estadios observamos que su valor medio en el estadio A fue de 14.8 con una desviación típica de 1.8 en el estadio B fue de 14 con una desviación de 1.7; en el estadio C fue de 23.7 con una desviación de 4.1 y en el estadio D fue de 34.2 con una desviación de 7.

Al relacionar los valores globales de VSG con la supervivencia de los pacientes encontramos significación estadística en el sentido de que a mayor VSG menor supervivencia (fig. 32).

Figura 32



No se observó significación estadística al comparar el BUN y la creatinina con la supervivencia.

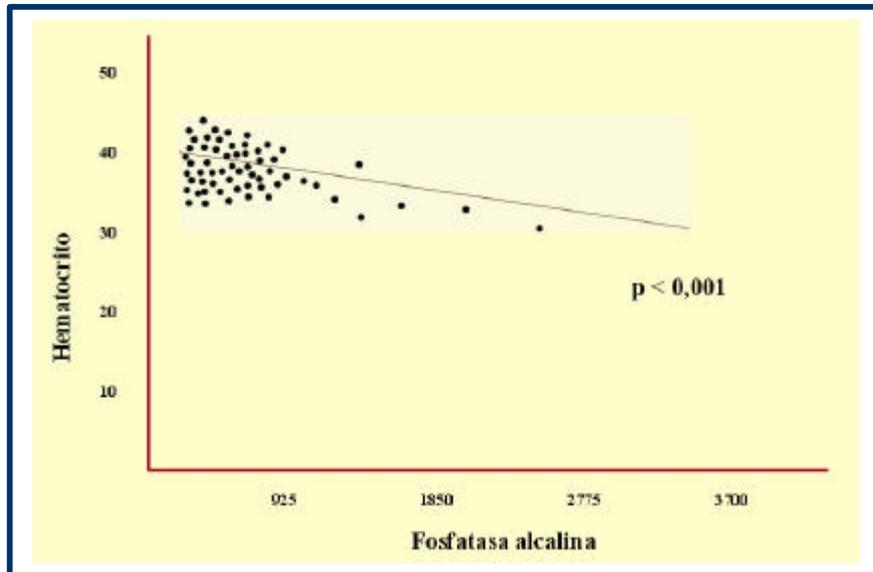
En la correlación de los valores de fosfatasa alcalina con los estadios clínico-patológicos se observó significado estadístico encontrándose valores marcadamente superiores en los estadios más avanzados. También se encontró, como era de esperar, correlación estadísticamente significativa entre los niveles de fosfatasa alcalina y la existencia de metástasis óseas.

Al analizar la relación entre fosfatasa alcalina y diversos parámetros patológicos como score VACURG-Gleason, grado nuclear, necrosis, invasión capsular, invasión perineural e inflamación estromal encontramos diferencias estadísticamente significativas coincidiendo los niveles altos de fosfatasa alcalina con scores y grados nucleares más elevados, con la existencia de necrosis, de invasión capsular, invasión perineural e inflamación del estroma.

Comparando los valores de fosfatasa alcalina con la supervivencia de los pacientes obtuvimos, también, significación estadística, en el sentido de que se encontraron valores más elevados de ésta en pacientes registrados como fallecidos.

En la correlación de los niveles de fosfatasa alcalina con el hematocrito encontramos significación estadística en el sentido de que niveles elevados de fosfatasa alcalina coincidían con cifras más bajas de hematocrito (fig. 33).

Figura 33



Al relacionar los niveles de fosfatasa alcalina con la presencia de metástasis hepáticas no se observó diferencia estadísticamente significativa.

No se encontró significación estadística al comparar las cifras de fosfatasa ácida prostática con los diferentes estadios ni tampoco con la supervivencia. Si bien, hay que señalar que ésta sólo apareció registrada en 70 del total de los historiales clínicos.

El antígeno prostático específico (PSA) sólo se encontró reflejado en 19 de los casos por lo que no fue analizado como factor pronóstico.

Al correlacionar el motivo de consulta con la positividad del urinocultivo encontramos significación estadística entre las dos variables. De los pacientes que consultaban por prostatismo, 25 tenían urinocultivo positivo.

Al analizar la supervivencia de los pacientes y correlacionarla con la existencia o no de metástasis óseas o hepáticas obtuvimos significado estadístico en el sentido de que los pacientes con metástasis presentaron un pronóstico claramente adverso (figs. 34 y 35).

Figura 34

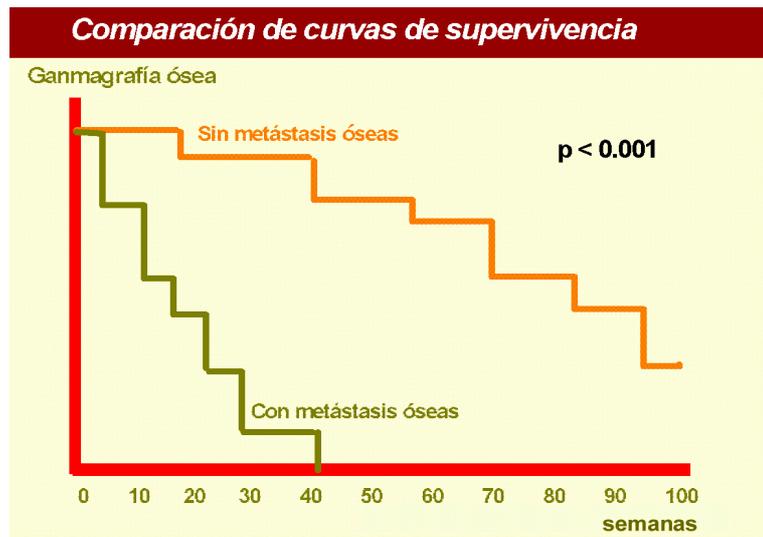
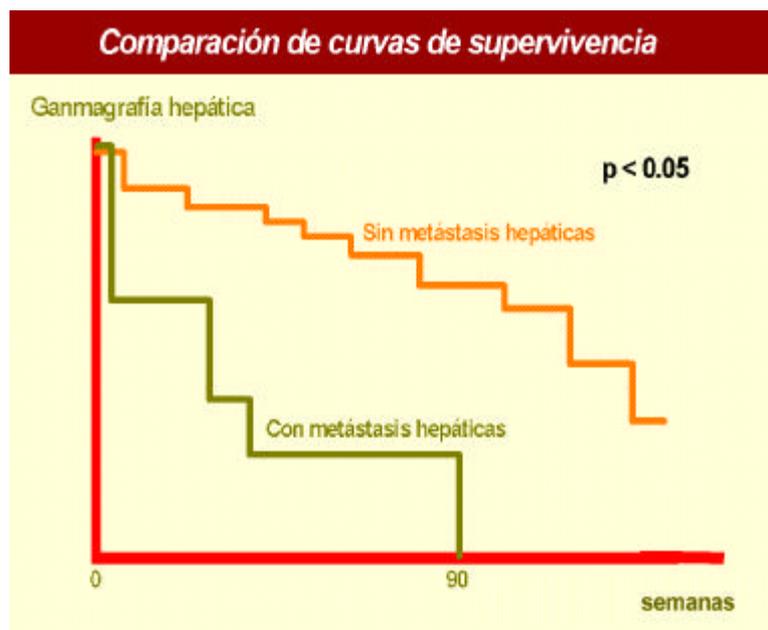


Figura 35



Cuando correlacionamos los estadios clínicos-patológicos con la supervivencia observamos que cuando la enfermedad sobrepasa el estadio B la incidencia de mortalidad aumenta de forma significativa. Al correlacionar los estadios, considerados globalmente, con la causa de muerte no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

En relación a la causa de muerte, del total de defunciones (75), 59 fueron por adenocarcinoma de próstata mientras que 16 fueron por otras causas. Cuando contabilizamos el número de años vividos por estos dos subgrupos de pacientes, observamos que la supervivencia fue superior en los pacientes que fallecieron por causa no relacionada con esta neoplasia.

La supervivencia media de los pacientes que murieron por adenocarcinoma de próstata fue de 49.3 meses con una desviación típica de 21.2 mientras que la de los pacientes que murieron por otra causa fue de 71.6 meses con una desviación típica de 17.1

## 4.2.- RESULTADOS PATOLÓGICOS

4.2.1.- DATOS MORFOLÓGICOS.- Se expone la relación e incidencia de hallazgos morfológicos en el material biopsico estudiado.

### 4.2.1.1.- Distribución de casos según grado histológico (VACURG-Gleason)

Según queda reflejado en la tabla III, de un total de 108 casos del estudio, la cifra más alta de incidencia, con más del 50% de los casos, la constituyó los índices sumatorios o score de 6. La frecuencia fue sensiblemente menor para puntuaciones de 7 y 8. En cualquier caso, las formas pobremente diferenciadas (score de 9 y 10) y

bien diferenciadas (scores 3,4 y 5) fueron relativamente poco frecuentes con porcentajes de 13.8% y 11.11% respectivamente.

TABLA III

Nº de pacientes	
Score 3	2
Score 4	4
Score 5	9
Score 6	55
Score 7	14
Score 8	12
Score 9	3
Score 10	9
Total	108

#### 4.2.1.2.- Grado nuclear

En lo referente al grado nuclear, el mayor número de casos con 52 pacientes (48.14%) lo constituyó el grado 2. Le siguieron en frecuencia el grado 1 (39.81%) y el 3 (12.03%).

#### 4.2.1.3.- Necrosis tumoral

Fenómenos de necrosis tumoral, tanto extensa como focal, estuvieron presentes en 13 casos, lo que representa el 12.03% del total de nuestra casuística. Un tipo de necrosis focal fue el comedocarcinomatoso, que lo apreciamos en 7 de los 13 casos que mostraron necrosis.

Correlacionando la necrosis con el índice sumatorio de VACURG- Gleason ( tabla IV ), se comprueba que los casos de puntuación baja (3, 4 y 5 ) no presentaron

necrosis, mientras que en seis de doce casos (50%) con puntuación alta (9 y 10) estuvo presente la necrosis.

TABLA IV

	Sin necrosis	Con Necrosis
<i>Score 3</i>	3	-
<i>Score 4</i>	4	-
<i>Score 5</i>	9	-
<i>Score 6</i>	54	1
<i>Score 7</i>	10	3
<i>Score 8</i>	9	3
<i>Score 9</i>	1	2
<i>Score 10</i>	5	4

En la relación grado nuclear con necrosis (tabla V), se observó igualmente que en gradación baja ó 1, no estuvo presente la necrosis, mientras que en 6 de 13 casos (46.15%) con gradación alta de 3 se apreció necrosis.

TABLA V

	Sin necrosis	Con Necrosis
<i>G. Nuclear 1</i>	43	-
<i>G. Nuclear 2</i>	45	7
<i>G. Nuclear 3</i>	7	6

En la interrelación del tipo de necrosis tumoral con el índice sumatorio de VACURG-Gleason (Tabla VI), se comprobó que la necrosis comedocarcinomatosa es propia de puntuaciones altas (8,9 y 10), lo que no sorprende ya que este tipo de necrosis es característica del patrón histológico más alto (ó 5 de Gleason).

TABLA VI

	Tipo de necrosis	
	Comedocarcinoma	No comedocarcinoma
<i>Score 6</i>	-	1
<i>Score 7</i>	-	3
<i>Score 8</i>	3	-
<i>Score 9</i>	1	1
<i>Score 10</i>	3	1

#### 4.2.1.4.- Inflamación del estroma

Se ha considerado en el estudio, el que exista respuesta inflamatoria mononuclear significativa del estroma tumoral (estroma-reacción). El fenómeno se evidenció en 16 de los casos (14.81% del estudio).

Relacionando la estroma-reacción con el índice sumatorio de VACURG-Gleason (tabla VII), se observó el fenómeno paradójico con respecto a otras neoplasias, de que ninguno de los scores bajos (3,4 y 5), presentaron significativa respuesta inflamatoria del estroma. El índice sumatorio de 6 se encontró en más de la mitad de los tumores (62.5%) con estroma-reacción manifiesta.

TABLA VII

<b>Respuesta inflamatoria del estroma</b>				
	<b>Respuesta estromal</b>		<b>No respuesta estromal</b>	
	<b>nº</b>	<b>%</b>	<b>nº</b>	<b>%</b>
<i>Score 3</i>	-	-	2	2.15
<i>Score 4</i>	-	-	2	2.15
<i>Score 5</i>	-	-	9	9.67
<i>Score 6</i>	10	62.5	50	54.34
<i>Score 7</i>	1	6.25	12	12.90
<i>Score 8</i>	3	18.75	8	8.60
<i>Score 9</i>	1	6.25	2	2.15
<i>Score 10</i>	1	6.25	7	7.52
<b>TOTAL</b>	<b>16</b>		<b>92</b>	

Correlacionando la reacción inflamatoria del estroma con el grado nuclear (tabla VIII), se observa un buen porcentaje de casos (40%) en los que coincidía una significativa respuesta inflamatoria del estroma con grado nuclear bajo, mientras que fue relativamente baja dicha respuesta (13.33%) en casos de alta gradación nuclear (grado 3).

TABLA VIII

<b>Respuesta inflamatoria del estroma</b>				
	<b>Respuesta estromal</b>		<b>No respuesta estromal</b>	
	<b>n.º</b>	<b>%</b>	<b>n.º</b>	<b>%</b>
<i>G. Nuclear 1</i>	6	40	39	41.9
<i>G. Nuclear 2</i>	7	46.6	44	47.3
<i>G. Nuclear 3</i>	2	13.3	10	10.7
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>		<b>93</b>	

#### 4.2.1.5.- Invasión perineural

Se observó variablemente este fenómeno en el estudio, independientemente del tipo de biopsia (cilíndrico prostático, resección transuretral - RTU - y pieza quirúrgica), en 63 casos, lo que representa el 58.33% del total de nuestra casuística. En la distribución por tipos de biopsia, invasión perineural se apreció en el 57.53% de biopsias de cilindros prostáticos, en el 68% de RTU y en el 40% de piezas quirúrgicas (de las preparaciones archivadas).

#### 4.2.1.6 Invasión capsular prostática

De los 108 casos en los que se valoró posible invasión de la cápsula prostática, se comprobó el fenómeno en 19 casos, lo que representa el 17.59% de la casuística. Atendiendo al tipo de biopsia, invasión capsular se observó en el 17.80% de los cilindros prostáticos, en el 12% de las RTU y en el 30% de las piezas quirúrgicas.

#### 4.2.1.7 Extensión tumoral (estadio)

El grado de extensión tumoral se ha determinado a partir de los datos anatómo-patológicos del material de biopsia (fundamentalmente en piezas de prostatectomía), pero preferentemente de datos de los historiales clínicos procedentes de exámenes complementarios (particularmente del estudio radiológico y analítico). El estudio de valoración del estadio clínico-patológico se ha hecho siguiendo la clasificación de Whitmore-Jewett, resultando aplicable en los 108 casos (fig. 28) con la siguiente distribución: 8 en estadio A (7.40%), 54 en estadio B (50%), 15 en estadio C (13.88%) y 31 en estadio D (28.70%).

En la correlación del estadio con el grado histológico (VACURG) los hallazgos quedan reflejados en las tablas IX, X, XI y XII. En el estadio A se comprueba que la mayoría de los casos coinciden con grados histológicos iguales o por debajo de 6 (7 de 8 casos). En el estadio B, el mayor número de casos se encuentra dentro del índice sumatorio de 6 (54.54% de los casos), si bien la frecuencia relativa incidió más

para el score o puntuación 5 ( 77.77% del total de casos con dicho índice sumatorio). En el estadio C la mayoría de los casos presentaron un score de 6 ( 60.00 %), aunque un buen porcentaje de casos mostraron puntuaciones altas ( $> \text{ó} = 8$ ) con un 33.33% del grupo. Por último, en el estadio D también el mayor número de casos presentaron puntuaciones de 6 (45.16%), siendo relativamente frecuentes las puntuaciones altas ( $> \text{ó} = 8$ ) con un 35.48%; de hecho , la mitad de los casos con el score 8 se encontraban en este estadio.

TABLA IX

Estadio A		
	nº	%
Score 3	2/2	100
Score 4	1/4	25
Score 5	1/9	11.11
Score 6	3/55	5.45
Score 7	1/14	7.14

TABLA X

Estadio B		
	nº	%
Score 4	1/4	25
Score 5	7/9	77.77
Score 6	30/55	54.54
Score 7	7/14	50
Score 8	4/12	33.33
Score 9	1/3	33.33
Score 10	4/9	44.44

TABLA XI

<b>Estadio C</b>		
	<b>nº</b>	<b>%</b>
Score 6	9/54	16.66
Score 7	1/14	7.14
Score 8	1/12	8.33
Score 9	2/13	66.66
Score 10	2/9	22.22

TABLA XII

<b>Estadio D</b>		
	<b>nº</b>	<b>%</b>
Score 5	1/9	11.11
Score 6	14/55	25.45
Score 7	5 /14	35.71
Score 8	6/12	50
Score 9	1/3	33.33
Score 10	4/9	44.44

Relacionando el estadio con el grado nuclear, se ha observado que en el estadio A, casi todos los casos presentaron grado nuclear 1, frente a ningún caso con grado nuclear 3 ( tabla XIII). En el estadio B, la proporción de casos con grado nuclear 1 y 2 se encuentra equilibrada y se observa algún caso en grado 3 (tabla XIV). En el estadio C, la mayoría de los casos presentaron grado nuclear 2 (66.66%) (Tabla XV). En el estadio D, fue destacar que el 53.84% de todos los grados nucleares 3 coincidieron con este estadio (tabla XVI).

TABLA XIII

<b>Estadio A</b>		
	<b>nº</b>	<b>%</b>
<i>G. nuclear 1</i>	6/43	13.95
<i>G. nuclear 2</i>	2/52	3.84
<i>G. nuclear 3</i>	0/13	0.00

TABLA XIV

<b>Estadio B</b>		
	<b>nº</b>	<b>%</b>
<i>G. nuclear 1</i>	25/43	58.13
<i>G. nuclear 2</i>	25/52	48.07
<i>G. nuclear 3</i>	4/13	30.76

TABLA XV

<b>Estadio C</b>		
	<b>nº</b>	<b>%</b>
<i>G. nuclear 1</i>	3/43	6.97
<i>G. nuclear 2</i>	10/52	19.23
<i>G. nuclear 3</i>	2/13	15.38

TABLA XVI

<b>Estadio D</b>		
	<b>nº</b>	<b>%</b>
<i>G. nuclear 1</i>	9/43	20.93
<i>G. nuclear 2</i>	15/52	28.84
<i>G. nuclear 3</i>	7/13	53.84

En pacientes fallecidos, al comparar el estadio tumoral con la presencia de necrosis, resaltamos la ausencia de necrosis en el estadio A y la frecuencia relativamente alta de casos con necrosis en el estadio D (41.66% del grupo) (Tabla XVII).

TABLA XVII

<b>Necrosis tumoral en pacientes fallecidos</b>	
<i>Estadio A</i>	-
<i>Estadio B</i>	6
<i>Estadio C</i>	1
<i>Estadio D</i>	5

#### 4.2.2.- DATOS DE ANÁLISIS DEL ADN POR CITOMETRÍA DE FLUJO

En este tipo de estudio, 38 de los casos generaron histogramas de buena calidad (Tablas anexas XLIII, XLIV y XLV), considerando como tales aquellos en los que el tumor expresaba un histograma con más de 25.000 núcleos celulares, y que además el pico de la población de células en fase de reposo (*G<sub>0</sub> G<sub>1</sub>*) del pico aneuploide, ofrecía coeficientes de variación (C.V.) por debajo o rondando al 7%. Este grupo de casos permitió no sólo el estudio de la ploidía del ADN, sino también el porcentaje de células en fase S (síntesis). En los 44 casos restantes, cuyos histogramas mostraban población tumoral baja (<25.000 núcleos celulares) y/o CV > 7.2%, sólo se pudo valorar con cierta precisión el índice de ADN y consiguientemente el tipo de ploidía.

#### 4.2.2.1.- Incidencia del tipo de ploidía y correlación con el grado de diferenciación histológica y el grado nuclear

En 82 casos el material fue suficientemente satisfactorio para determinar la ploidía tumoral. De los mismos, 19 casos (23.17%) fueron aneuploides y 63 casos (76.82%) fueron diploides (Índice de ADN=1).

Consideramos como tumores aneuploides aquellos que ofrecían índices de ADN (I ADN) por debajo o encima de 1 (tabla XVIII): un caso fue hipodiploide (I ADN<1), 5 tetraploides (I ADN= 1.94-2.17), 12 aneuploides no tetraploides (I ADN= 1.40-1.84) y un caso presentaba más de una población aneuploide (multiploide).

TABLA XVIII

	Tipo de aneuploidía			
	Índice de ADN			
	I ADN < 1	I ADN = 1.40-1.84	I ADN = 1.94-2.17	Multiploide
Score 6	1	4	5	-
Score 7	-	4	-	-
Score 8	-	1	-	1
Score 9	-	1	-	-
Score 10	-	2	-	-
TOTAL	1	12	5	1

Correlacionando el tipo de ploidía con el índice sumatorio de VACURG-Gleason (tabla XIX), comprobamos que la aneuploidía no se presentó en formas bien diferenciadas (puntuaciones de 3, 4 y 5) y que en formas pobremente diferenciadas (9 y 10), 3 casos fueron aneuploides, lo que representa el 42.85% de los mismos en que se calculó la ploidía. Los casos más frecuentes de aneuploidía, con un 84.21%, coincidieron con formas moderadamente diferenciadas (puntuaciones de 6,7 y 8), aunque el tanto por ciento de frecuencia relativa respecto de tumores diploides fue 24.24%.

TABLA XIX

		Ploidía	
		Diploidía	Aneuploidía
<i>Bien diferenciado</i>	Score 3	1	-
	Score 4	2 (14.2 %)	- (0 %)
	Score 5	6	-
<i>Moderadamente diferenciado</i>	Score 6	36	10
	Score 7	6 (79.3 %)	4 (84.21%)
<i>Pobremente diferenciado</i>	Score 8	8	2
	Score 9	1 (6.3 %)	1 (15.78 %)
	Score 10	3	2
<i>TOTAL</i>		63	19

En la relación del tipo de ploidía con el grado nuclear (tablas XX y XXI), de los grados 1 fueron diploides el 85.71% de los casos, y el resto aneuploides, mientras que de los grados 3 el 60% fueron diploides y el 40% aneuploides. Si bien el número de casos de aneuploidía fue más frecuente en el grado 2, con 10 casos, la frecuencia relativa con respecto a tumores diploides fue de 27.02%.

TABLA XX

	Tipo de aneuploidía			
	Índice de AND:			
	I ADN < 1	I ADN = 1.40 - 1.84	I ADN = 1.94 - 2.17	Multiploide
<i>G.nuclear 1</i>	-	3	2	-
<i>G nuclear 2</i>	1	5	3	1
<i>G.nuclear 3</i>	-	4	-	-
<i>TOTAL</i>	1	12	5	1

TABLA XXI

	Ploidía	
	Diploide	Aneuploide
<i>G. nuclear 1</i>	30 (45.2 %)	5 (26.31 %)
<i>G. nuclear 2</i>	27 (42.8 %)	10 (52.63 %)
<i>G. nuclear 3</i>	6 (9.5 %)	4 (21.05 %)
<i>TOTAL</i>	63	19

4.2.2.2.- Índice proliferativo ( porcentaje de células en fase S) y ploidía en relación con el grado de diferenciación histológica y el grado nuclear

Este tipo de estudio sólo se pudo realizar en un número más limitado de casos ( 38 casos), cuya muestra tumoral reflejaba histogramas con más de 20.000 unidades o núcleos y coeficiente de variación iguales o por debajo de 7.

Consideramos como índices proliferativos altos, aquellos que se encuentran por encima del 10%; por tanto en el caso de los tumores diploides, evidenciamos índices bajos en el 38.70% de los casos y altos en el 61.29% restante. Todos los tumores aneuploides presentaron índices de proliferación altos por encima del 15%.

TABLA XXII

	Índice Proliferativo (% fase S)		
	Diploide		Aneuploide
	< 10 %	> 10 %	> 15 %
<i>Score 3</i>	-	1 (5.26 %)	-
<i>Score 4</i>	-	1 (5.26 %)	-
<i>Score 5</i>	1 (8.3 %)	2 (10.5 %)	1 (14.28 %)
<i>Score 6</i>	8 (66.6 %)	5 (26.3 %)	2 (28.57 %)
<i>Score 7</i>	2 (16.6 %)	4 (21.5 %)	2 (28.57 %)
<i>Score 8</i>	1 (8.3 %)	3 (15.7 %)	1 (14.28 %)
<i>Score 9</i>	-	-	-
<i>Score 10</i>	-	3 (15.7 %)	1 (14.28 %)
<i>TOTAL</i>	12	19	7

En la correlación del índice proliferativo y el grado histológico VACURG-Gleason de tumores diploides, la mayor parte de los casos ofrecían puntuaciones entre 6 y 8 (moderadamente diferenciados), si bien los tres únicos casos con puntuación de 10 mostraron índices de proliferación por encima del 10%. Un hecho similar ocurrió en los tumores aneuploides en cuanto a distribución por puntuaciones de VACURG-Gleason, aunque en todos ellos el índice proliferativo fue alto, como ya señalamos con anterioridad (Tabla XXII).

Interrelacionando el índice de proliferación con el grado nuclear en tumores diploides (tabla XXIII), comprobamos que ninguno de los casos con un grado nuclear alto (3), mostraron índices de proliferación por debajo de 10, y en contrapartida, grados nucleares bajos, de 1, coincidían en un alto porcentaje (55.5%) de casos, con índice proliferativo por debajo de 10. En tumores aneuploides se repartieron por igual

los casos entre grados nucleares, si bien la frecuencia relativa, y en conjunto con los tumores diploides fue de 11.11% para el grado 1, 18.75% para el grado 2 y 50% para el grado 3.

TABLA XXIII

	Índice proliferativo (% fase S)		
	Diploide		Aneuploide
	< 10 %	> 10 %	> 15 %
<i>G. nuclear 1</i>	10 (83.3 %)	6 (31.5 %)	2 (28.5 %)
<i>G. nuclear 2</i>	2 (16.6 %)	11 (57.9 %)	3 (42.8 %)
<i>G. nuclear 3</i>	-	2 (10.5 %)	2 (28.5 %)
<b>TOTAL</b>	<b>12</b>	<b>19</b>	<b>7</b>

#### 4.2.2.3.- Correlación entre ploidía e invasión tumoral perineural

Invasión perineural se evidenció en 78.94% de los tumores aneuploides analizados y en el 58.73% de los tumos diploides (tabla XXIV).

TABLA XXIV

	Invasión perineural	
	Diploide	Aneuploide
<i>Cilindro</i>	23/38 (60.5 %)	7/10 (70 %)
<i>RTU</i>	12/18 (66.6 %)	6/7 (85.7 %)
<i>Pieza</i>	2/7 (28.5 %)	2/2 (100 %)
<b>TOTAL</b>	<b>37/63 (58.7 %)</b>	<b>15/19 (78.9 %)</b>

En la correlación de la invasión perineural, tipo de ploidía tumoral y procedimiento biopsico (cilindro, RTU y pieza de prostatectomía), se apreció con relativa frecuencia invasión perineural, independientemente del tipo de biopsia; si bien, curiosamente esta cifra fue baja en piezas quirúrgicas de tumores diploides (28.57%),

quizás porque la diploidía se correlaciona con menor agresividad tumoral, dado que en todos los casos de piezas con tumores aneuploides (100%) sí se demostró invasión perineural.

#### 4.2.2.4.- Correlación entre ploidía e invasión tumoral de la cápsula prostática

Invasión capsular prostática se demostró en el 21.05% de tumores aneuploides y en el 17.74% de los tumores diploides (tabla XXV).

TABLA XXV

	Invasión capsular	
	Diploide	Aneuploide
<i>Cilindro</i>	9/39 (23.07 %)	0/9 (0 %)
<i>RTU</i>	1/17 (5.8 %)	2/8 (25 %)
<i>Pieza</i>	1/7 (14.2 %)	2/2 (100 %)
<b>TOTAL</b>	<b>11/63 (17.46 %)</b>	<b>4/19 (21 %)</b>

En la correlación de invasión capsular, tipo de ploidía tumoral y procedimiento biopsico (cilindro, RTU y prostatectomía), hay que señalar que los resultados en cilindros y RTU no ofrecieron buen rendimiento en cuanto a la detección de invasión perineural (independientemente de la ploidía), posiblemente en razón a lo azaroso del procedimiento biopsico. El estudio en piezas quirúrgicas, es el que puede arrojar resultados fidedignos y de referencia, de modo que se observó invasión capsular en el 100% de los tumores aneuploides, frente al 14.28% de los tumores diploides.

#### 4.2.2.5.- Correlación entre estadio y ploidía ( ADN).

Relacionando sistemáticamente los diferentes tipos de estadios clínico-patológicos con la presencia de diploidía o aneuploidía en el tumor ( ploidía), observamos que en el estadio A (tabla XXVI), casi todos los casos (87.50%) son tumores diploides, siendo sólo uno aneuploide (12.50%). En el estadio B (tabla XXVII)

predominan los tumores diploides (85.29%), y dentro de los aneuploides son algo más frecuentes las tetraploidías con respecto a las aneuploidías no tetraploides (3 de 5 casos). En el estadio C (tabla XXVIII), las aneuploidías fueron algo más frecuentes con un 30%. En el estadio D (tabla XXIX), aumenta la aneuploidía al 38%, y dentro de los aneuploides predominan los tumores no tetraploides con un 75% del total.

TABLA XXVI

<b>Estadio A</b>		
<i>Diploides</i>	7/63 (87.50 %)	(11.11 % del total)
<i>Aneuploides</i>	1/19 (12.50 %)	(5.26 % del total)
- No tetraploides .....1		
<b>TOTAL</b>	<b>8</b>	

TABLA XXVII

<b>Estadio B</b>		
<i>Diploides</i>	29/63 (85.29 %)	(46.03 % del total)
<i>Aneuploides</i>	5/19 (14.70 %)	(26.31 % del total)
- Tetraploides.....3		
- No tetraploides.....2		
<b>TOTAL</b>	<b>34</b>	

TABLA XXVIII

<b>Estadio C</b>		
<i>Diploides</i>	7/63 (70 %)	(11.11 % del total)
<i>Aneuploides</i>	3/19 (30 %)	(15.78 % del total)
-Tetraploides.....2		
- No tetraploides.....1		
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	

TABLA XXIX

<b>Estadio D</b>		
<i>Diploides</i>	13/63 (61.90 %)	(20.63 % del total)
<i>Aneuploides</i>	8/19 (38.09 %)	(42.10 % del total)
- Hipodiploide.....1		
- Hiperdiploide.....1		
- No tetraploide.....6		
<b>TOTAL</b>	<b>21</b>	

#### 4.2.2.6.- Correlación entre índice proliferativo (porcentaje de células en fase S) y estadio con el grado histológico (VACURG) y el grado nuclear

Solamente en el estadio de extensión tumoral B se ha recogido un número suficiente de tumores diploides para correlacionar el índice proliferativo con el score (VACURG-Gleason) y grado nuclear respectivamente.

En la relación del score (VACURG) con índices proliferativos bajos (<10%) y altos (>10%) (tabla XXX), se comprobó coincidencia de índices bajos con scores o índices sumatorios relativamente bajos (exclusivamente grado 6 y 7). Índices proliferativos altos coincidieron con un scores más dispersos (5-10), siendo relativamente frecuentes en puntuaciones o scores altos (> ó = 8), con un 33.33% de los casos.

TABLA XXX

	<b>Índice proliferativo de tumores diploides en estadio B</b>	
	<b>&lt; 10 %</b>	<b>&gt; 10 %</b>
<b>Score 5</b>	-	1
<b>Score 6</b>	6	4
<b>Score 7</b>	1	3
<b>Score 8</b>	-	2
<b>Score 10</b>	-	2
<b>TOTAL</b>	<b>7</b>	<b>12</b>

Correlacionando el grado nuclear con el índice proliferativo de acuerdo con los criterios anteriormente expuestos (Tabla XXXI) observamos que los casos con índices proliferativos bajos (por debajo del 10%) coincidieron fundamentalmente con el grado nuclear 1, y que no se presentaron casos con grado nuclear 3. En contrapartida, índices proliferativos altos (>10%) se presentaron en bastantes casos con grado nuclear relativamente alto (2-3).

TABLA XXXI

<b>Índice proliferativo de tumores diploides en estadio B</b>		
	<b>&lt; 10 %</b>	<b>&gt; 10 %</b>
<i>G. nuclear 1</i>	6	4
<i>G. nuclear 2</i>	1	7
<i>G. nuclear 3</i>	-	1
<b>TOTAL</b>	7	12

#### 4.2.3.- CORRELACIÓN ENTRE DATOS PATOLÓGICOS Y SUPERVIVENCIA

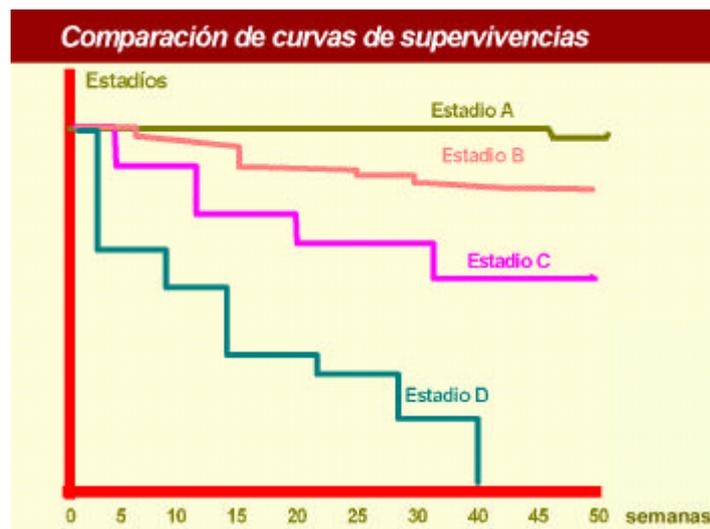
##### 4.2.3.1.- Estadio y supervivencia

Realizado el estudio de los 108 pacientes, se ha comprobado fallecimiento en 75 casos, lo que representa el 69.44% del total (Tabla XXXII). En el estadio A sobreviven la mayoría (87.5%), mientras que en el estadio D, ninguno de los 31 pacientes sobrevivieron. Igualmente, el estadio C comporta un mal pronóstico con un 86.6% de fallecidos.

TABLA XXXII

	Supervivencia	
	Muertos	Vivos
<i>Estadio A</i>	1 (12.5 %)	7 (87.5 %)
<i>Estadio B</i>	30 (55.55 %)	24 (44.44 %)
<i>Estadio C</i>	13 (86.66 %)	2 (13.33 %)
<i>Estadio D</i>	31 (100 %)	-
<i>TOTAL</i>	75 (69.44 %)	33 (30.55 %)

Figura 36



#### 4.2.3.2.- Grado de diferenciación y supervivencia

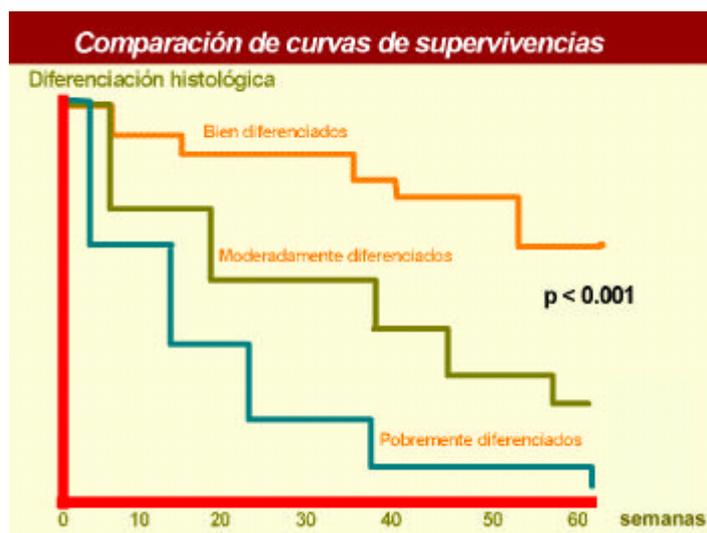
En este caso, aplicamos la misma sistemática de estudio a los pacientes, pero comparando la supervivencia con el grado de diferenciación (tabla XXXIII): bien diferenciados (score 2-5), moderadamente diferenciados (score 6-8) y pobremente diferenciados (score 9-10). Se comprueba que en las formas bien diferenciadas

sobreviven la mayoría de los pacientes (73.33%) mientras que en las formas pobremente diferenciadas la mayor parte de los pacientes han fallecido (86.36%).

TABLA XXXIII

	Supervivencia	
	Muertos	Vivos
<i>Bien diferenciados</i>	4	11
<i>Moderadamente diferenciados</i>	52	19
<i>Pobremente diferenciados</i>	19	3
<i>TOTAL</i>	75	33

Figura 37



#### 4.2.3.3.- Grado nuclear y supervivencia

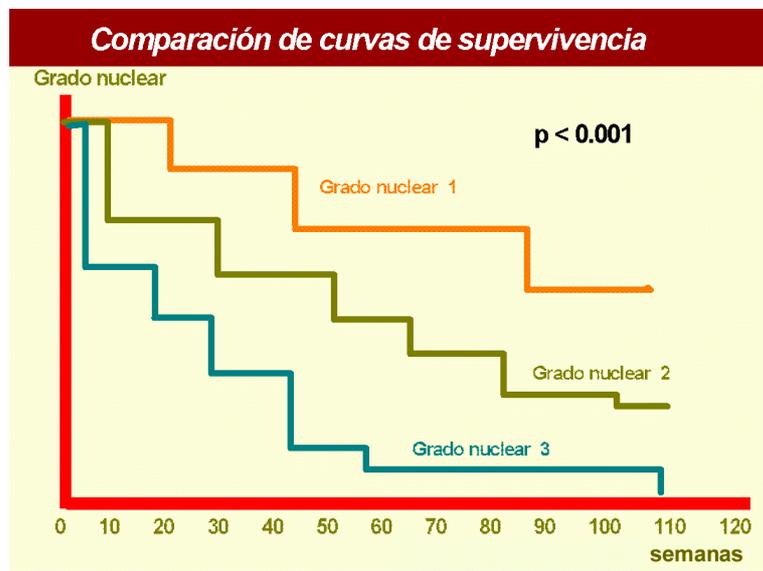
En la correlación del grado nuclear del tumor con la supervivencia, se han observado como hechos más destacables que en el grado nuclear 1 sobreviven la

mayoría de los pacientes (60.46%), mientras que en el grado nuclear 3 todos los pacientes han fallecido (tabla XXXIV)(fig.34).

TABLA XXXIV

	Supervivencia	
	Muertos	Vivos
<i>G. nuclear 1</i>	17	26
<i>G. nuclear 2</i>	45	7
<i>G. nuclear 3</i>	13	-
<i>TOTAL</i>	75	33

Figura 38



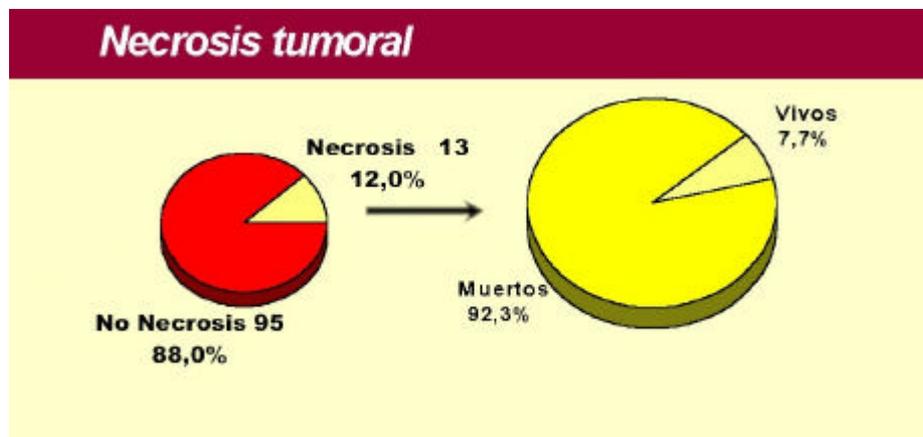
#### 4.2.3.4.- Necrosis tumoral y supervivencia

Comparando la supervivencia de los pacientes en nuestra casuística con la presencia o ausencia de necrosis resaltamos la observación de que casi todos los tumores con necrosis coincidían con pacientes ya fallecidos (92.3%)(tabla XXXV)(fig35).

TABLA XXXV

	Supervivencia	
	Muertos	Vivos
<i>Con necrosis</i>	12	1
<i>Sin necrosis</i>	63	32
<i>TOTAL</i>	75	33

Figura 39



#### 4.2.3.5.- Respuesta inflamatoria del estroma tumoral y supervivencia.

En la valoración de la presencia de respuesta inflamatoria del estroma tumoral (estroma-reacción) con respecto a la supervivencia, se apreció que era mayor el número de casos de pacientes fallecidos con estroma-reacción que los que

sobrevivieron, sin embargo, la frecuencia relativa con respecto al total de casos (incluidos casos sin estroma-reacción) era bastante similar, entre 14 y 15% (tabla XXXVI).

En relación con el estadio ningún caso del estadio A presentó significativa estroma-reacción, sin embargo, si estuvo presente en 2 de los fallecidos en el estadio D.

TABLA XXXVI

	Supervivencia	
	Muertos	Vivos
<i>Estadio A + Estroma-reacción</i>	-	-
<i>Estadio B + Estroma-reacción</i>	7	4
<i>Estadio C + Estroma-reacción</i>	2	1
<i>Estadio D + Estroma-reacción</i>	2	-
<i>TOTAL</i>	11/75 (14.66 %)	5/33 (15.15 %)

#### 4.2.3.6.- Ploidía (ADN) y supervivencia

Del total de 108 pacientes del estudio, en 82 casos se pudo valorar la ploidía y relacionarla con la supervivencia de los pacientes (tabla XXXVII). La cifra de pacientes fallecidos en este tipo de estudio prácticamente duplicaba a la de pacientes vivos. La relación de pacientes fallecidos con respecto a los vivos fue superior en los

casos con tumores aneuploides. Sin embargo, en el análisis estadístico no se obtuvo correlación significativa entre la ploidía del ADN y la supervivencia (fig. 40).

TABLA XXXVII

	Supervivencia	
	Muertos	Vivos
<i>Diploides</i>	40	23
<i>Aneuploides</i>	15	4
<i>TOTAL</i>	55	27

Figura 40



#### 4.2.4.- RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS CON p53

Por circunstancias técnicas, solamente se pudo efectuar el estudio inmunohistoquímico de expresión de la proteína p53 en 35 casos: 26 casos de RTU, 7 casos de piezas quirúrgicas y 2 cilindros por punción. Del total, 10 casos (28.5%) expresaron relevante inmunotinción positiva para la p53.

##### 4.2.4.1.- Correlación con parámetros patológicos

###### a) Puntuación (score) Gleason versus expresión de p53

TABLA XXXVIII

	Total	(+)p53
<i>Baja puntuación (3-6)</i>	17	2(11.9%)
<i>Alta puntuación (7-10)</i>	18	8 (44.4%)
<i>TOTAL</i>	35	10 (28.5%)

###### b) Grado nuclear versus expresión de p53

TABLA XXXIX

	Total	(+) p53
<i>Grado 1</i>	14	0 (0%)
<i>Grado 2</i>	15	7 (46.6%)
<i>Grado 3</i>	6	3 (50%)

c) Necrosis tumoral versus expresión de p53

TABLA XL

	<b>p53(-)</b>	<b>p53(+)</b>
<i>Con necrosis</i>	4	5(55.5%)
<i>Sin necrosis</i>	21	5(19.2%)

4.2.4.2.- Correlación de parámetros de citometría de flujo (análisis de ADN) y expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor.

a) El análisis de la ploidía versus la expresión de p53, sólo se pudo realizar en 34 casos.

TABLA XLI

	<b>Diploides</b>	<b>Aneuploides</b>
<i>p53(+)</i>	7 (70%)	3 (30%)
<i>P53(-)</i>	18 (75%)	6 (25%)

b) La evaluación del índice proliferativo (% de células en fase S) versus la expresión de p53, se pudo efectuar en 25 casos.

TABLA XLII

	<b>Indice alto (&gt;10%)</b>	<b>Indice bajo (&lt;10%)</b>
<i>p53(+)</i>	6(100%)	0(0%)
<i>P53(-)</i>	16(84.2%)	3(15.7%)

## TABLAS ANEXAS

TABLA XLIII

CASO	INDICE ADN	% - S	% - G <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	% - G <sub>2</sub> M	C.V.		
					G <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> M	A G <sub>0</sub> G <sub>1</sub>
1011/87	1,96	15,65	81,92	2,39	3,81	3,03	3,76
511/88	1	14,85	74,98	10,16	6,44	7,95	-----
1890/90	1	18,86	72,95	10,19	6,25	6,70	-----
4858/84	1,66	25,10	71,04	1,10	6,97	1,80	6,49
1364/87	1,80	33,63	60,60	5,76	9,98	9,11	6,60
5888/93	1	12,11	80,10	7,79	6,40	6,98	-----
5835/92	1	13,65	79,74	6,61	4,19	5,28	-----
7201/92	1	10,45	85,19	4,36	4,51	5,27	-----
909/90	1	16,48	77,18	6,34	6,35	4,17	-----
1731/86	1	9,94	83,75	6,31	6,53	6,60	-----
169/87	1	13,58	78,52	7,90	5,74	4,08	-----
263/87	1	11,18	84,37	4,45	6,10	5,43	-----
1239/89	1	13,85	83,68	2,48	6,81	2,38	-----
3378/88	1	9,97	82,30	7,91	6,85	7,27	-----

TABLA XLIV

CASO	INDICE ADN	% - S	% - G <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	% - G <sub>2</sub> M	C.V.		
					G <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> M	A G <sub>0</sub> G <sub>1</sub>
2795/88	1	10,15	86,36	3,49	6,88	5,67	--
2806/87	1	10,93	78,48	10,59	6,54	3,71	--
58/89	1,94	32,92	67,53	--	7,01	8,12	5,85
4498/86	1	5,45	91,76	2,79	3,83	2,76	--
1447/87	1,73	29,88	65,13	4,98	5,53	4,51	6,68
6240/88	1	8,00	75,92	16,08	3,35	4,18	--
4402/85	1	14,99	80,68	4,33	6,67	4,65	--
5395/87	1	8,27	82,50	9,23	6,58	5,62	--
1797/88	1	17,67	80,60	1,73	6,95	2,73	--
4908/88	1	11,70	83,80	5,01	7,15	5,16	--
4847/86	1	12,55	84,92	2,53	4,38	6,16	--
3596/85	1	11,11	84,81	4,08	6,39	6,82	--
3875/86	1,80	29,07	70,92	--	5,87	1,23	6,50

TABLA XLV

CASO	INDICE ADN	% - S	% - G <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	% - G <sub>2</sub> M	G <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	C.V. G <sub>2</sub> M	A G <sub>0</sub> G <sub>1</sub>
1237/91	1	5,07	93,96	0,97	5,53	2,35	---
5632/91	1	5,72	92,78	1,50	5,89	1,81	---
723/87	1	5,33	87,51	7,17	6,19	6,66	---
1526/90	1	5,50	93,03	1,47	5,37	1,04	---
5105/87	1	6,06	91,30	2,64	6,34	4,02	---
3163/91	1	5,05	93,57	1,38	6,19	1,45	---
1030/90	1	5,36	92,52	2,12	6,22	1,81	---
4182/88	1	15,56	75,67	8,77	6,97	4,21	---
5642/91	1	12,00	71,61	16,39	5,57	5,39	---
423/90	1	11,79	80,62	7,60	3,52	5,36	---
4671/85	2	21,38	78,20	0,41	5,11	0,99	6,75

## 5.- DISCUSIÓN

En el campo de la investigación oncológica un objetivo primordial es la búsqueda de factores pronóstico, es decir, aquellos datos que nos aportan información sobre la evolución de la enfermedad. Los parámetros con carácter pronóstico son variables que intentan explicar la diferente evolución clínica de pacientes con igual diagnóstico aparente. El valor de algunos de estos factores puede ser diferente dependiendo del momento evolutivo; así, hay factores pronóstico con más relevancia al comienzo de la enfermedad que pierden importancia a medida que ésta progresa, a la vez que surgen otros que adquieren mayor trascendencia.

La identificación de factores que nos permitan distinguir los carcinomas prostáticos con pronóstico favorable de los tumores biológicamente más agresivos, así como determinar el riesgo potencial de defunción de cada paciente son, por lo tanto, objetivos principales en la uro-oncología.

Como ya ha sido referido en nuestro estudio, el carcinoma de próstata tiene una elevada incidencia y es la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo occidental en varones mayores de 55 años de edad. El envejecimiento de la población así como los avances en los métodos de screening para esta enfermedad, han contribuido para un aumento progresivo de su incidencia y notificación.

Es conocido que la velocidad de crecimiento del carcinoma de próstata es generalmente lenta. Para algunos autores, el tiempo de duplicación celular es de dos a cuatro meses<sup>79</sup> estimándose un tiempo mínimo de cuatro a diez años para que una sola célula desarrolle un tumor teóricamente detectable<sup>358</sup>.

Debido al lento crecimiento de este tumor, el porcentaje de células que se encuentra en fase de síntesis del ADN, en un momento dado, es muy bajo (inferior al 5 %), lo cual tiene como implicación práctica su poca sensibilidad al tratamiento quimioterápico, ya que como se sabe, la mayoría de citostáticos actúan sobre la síntesis del ADN<sup>358</sup>.

El carcinoma de próstata localizado es una enfermedad compleja y heterogénea con una historia natural potencial de más de 15 años<sup>373</sup>. El desarrollo de metástasis se ha estimado en un 50 % para pacientes con una evolución de 15 años<sup>373</sup>.

### 5.1.- HALLAZGOS CLÍNICOS Y BIOQUÍMICOS CON SIGNIFICADO PRONÓSTICO EN EL CARCINOMA PROSTÁTICO

En el presente trabajo el motivo de consulta se ha asociado fundamentalmente a síntomas del tracto urinario inferior. Es decir, que la mayoría de pacientes diagnosticados de carcinoma de próstata en el Hospital Universitario de Canarias lo han sido por síntomas de prostatismo. La relación entre síntomas de dificultad de vaciamiento vesical y pronóstico del carcinoma de próstata ha sido descrita; los pacientes con esta sintomatología tienen un pronóstico menos favorable que los pacientes con carcinoma de próstata asintomáticos para el mismo estadio y con igual grado histológico<sup>3,83,228</sup>. Aunque en nuestra serie no podemos establecer esta comparación, ya que no se estudiaron pacientes asintomáticos, algunos estudios sí lo indican<sup>3,83,228</sup>.

En relación al tacto rectal sabemos que su sensibilidad es elevada cuando es realizado por personal experimentado<sup>240</sup>. Sin embargo, este examen no está exento de dificultades en su valoración debido a las diferentes interpretaciones por parte de los distintos examinadores. Cuando analizamos la relación existente entre los hallazgos del examen rectal y el estadio, observamos significación estadística en el sentido de que dicho examen fue más indicativo de patología tumoral maligna en los estadios más avanzados. No obstante, no se apreció correlación al analizar la supervivencia. De ello se desprende que el tacto rectal, en nuestro estudio, tiene interés para la detección del cáncer pero no tiene valor pronóstico.

Cuando analizamos las curvas de supervivencia observamos que existe relación estadísticamente significativa entre el estadio y la supervivencia, de forma que a las 40 semanas han fallecido la totalidad de pacientes que se encontraban en estadio D en el

momento del diagnóstico. Por el contrario, en aquellos pacientes que en el momento del diagnóstico estaban en estadio A o B la supervivencia fue claramente mayor.

También hemos observado que la supervivencia de los pacientes que fallecieron por cáncer de próstata fue de 49.3 meses. Borre y cols<sup>45</sup>, analizando la evolución natural del cáncer de próstata en una población danesa observaron una supervivencia media de 38 meses habiendo fallecido el 62% por cáncer de próstata. En nuestro estudio, al concluir el periodo de seguimiento habían fallecido 75 pacientes. De acuerdo con las fuentes de información que nosotros utilizamos, 59 pacientes fallecieron por cáncer de próstata mientras que 16 fallecieron por otras causas. Teniendo en cuenta que la gran mayoría de pacientes incluidos en nuestro estudio no fueron tratados con intención curativa, coincidimos con Borre en que los hombres que padecen carcinoma prostático y reciben tratamiento paliativo tienden a morir por cáncer de próstata y no por otras causas. Es preciso señalar que durante los primeros 7 años del periodo de estudio (1984-1991) el tratamiento radical curativo del cáncer de próstata, en nuestro medio, era prácticamente inexistente.

#### 5.1.1.- Raza y estado civil

En nuestro estudio todos los pacientes eran de raza caucasiana; por esto, este factor no pudo ser analizado como variable pronóstica. En relación al estado civil tampoco hemos observado hallazgos significativos, sin embargo Krongrad y cols<sup>247</sup> han señalado que los pacientes casados tienen una supervivencia mayor a los solteros, divorciados o viudos. Según estos autores<sup>247</sup> es probable que estas diferencias estén relacionadas con diferentes comportamientos socio-familiares.

#### 5.1.2.- Edad

La edad del paciente en el momento del diagnóstico está en relación con la mortalidad cáncer-específica<sup>1, 175</sup>.

En nuestro estudio cuando realizamos un punto de corte en la cifra que representa la edad media de los pacientes, esto es, 69.7 años y comparamos la supervivencia cáncer-específica de los dos grupos de pacientes separados por ese valor, no encontramos diferencias significativas. Estos resultados coinciden con los aportados por algunos autores en la literatura actual<sup>160,371</sup>. Sin embargo, la mayoría de trabajos publicados señalan un peor comportamiento tumoral en pacientes más jóvenes<sup>17,472</sup>. La única referencia encontrada que indica lo contrario corresponde a Krongrad y cols.<sup>247</sup>, autores que refieren un aumento de la agresividad biológica y una mayor mortalidad enfermedad-específica con la edad.

En nuestra serie, dado su tamaño, no fue posible hacer comparaciones realizando puntos de corte en edades más extremas por el escaso número de pacientes que resultaba en cada uno de los grupos.

### 5.1.3.- Estadío.

La extensión de la enfermedad, en el momento del diagnóstico, depende de la precisión con que el diagnóstico es realizado y de la naturaleza de la evaluación efectuada por el clínico.

El sistema de estadije que se ha utilizado, por su simplicidad y fácil aplicación, es el de Whitmore-Jewett. De acuerdo con esta clasificación se incluyeron en el estadio A los tumores focales, incidentales, diagnosticados por resección transuretral o prostatectomía; en el estadio B los tumores clínicamente palpables confinados a la próstata; en el estadio C, los tumores con extensión local fuera de la glándula pero sin metástasis a distancia; y, en el estadio D los pacientes con metástasis a distancia.

El riesgo biológico del carcinoma de próstata en estadio A ha sido difícil de definir. Consecuentemente su abordaje terapéutico es objeto de controversia siendo propuesto por muchos autores una actitud conservadora o expectante, en el tratamiento de pacientes en este estadio<sup>218</sup>.

Prácticamente todas las series confirman la importancia pronóstica del estadio, el cual se relaciona significativamente con el periodo libre de enfermedad y con la supervivencia cáncer-específica <sup>72,160,182,287,337,349,350,371,397</sup>. En este sentido, nuestros resultados coinciden con los de estos estudios siendo el estadio uno de los parámetros con mayor significado pronóstico.

#### 5.1.4.- Metástasis

En el diagnóstico del carcinoma de próstata un objetivo principal es identificar la enfermedad en estadio A y B, es decir, sin invasión de ganglios linfáticos, ya que en estos casos es posible un tratamiento curativo.

La existencia de afectación linfática representa un poderoso parámetro pronóstico <sup>172</sup>. En algunas series se ha señalado que, incluso, un simple foco de metástasis en apenas uno de los múltiples ganglios linfáticos pélvicos es indicativo de que el carcinoma de próstata será incurable con las modalidades terapéuticas existentes: 70 % de estos pacientes mueren por carcinoma de próstata <sup>378</sup>. Sin embargo, debido a la larga historia natural del carcinoma de la próstata, muchos de estos pacientes se encuentran clínicamente bien a los 10 años del diagnóstico <sup>378</sup>.

La valoración exacta de la afectación linfática requiere métodos invasivos de estudio como la linfadenectomía pélvica. Durante la fase de recogida de datos para nuestro estudio observamos que este dato no aparecía registrado regularmente en los historiales clínicos por lo que no fue analizado como factor pronóstico.

Comprobamos, por otra parte, que un grupo importante de pacientes acudían a una primera consulta tardíamente con síntomas de enfermedad avanzada y de metástasis a distancia. El pronóstico en ellos fue desfavorable con una media de supervivencia de 22.8 meses. Estos resultados coinciden con los reflejados en algunas series <sup>9,155</sup>.

### 5.1.5.- Hemoglobina, Velocidad de Sedimentación Globular y Fosfatasa Alcalina

El valor pronóstico de la hemoglobina, velocidad de sedimentación globular (VSG) y fosfatasa alcalina en pacientes con metástasis óseas por carcinoma de próstata ha sido documentado en numerosas publicaciones <sup>103, 112, 232, 309</sup>. Nuestros hallazgos coinciden con los de estas series: la presencia de anemia importante, de elevación de la VSG y de las fosfatasas alcalinas representan, claramente, factores pronóstico adversos. En este sentido, en nuestro estudio, los pacientes con cifras de hemoglobina inferiores a 11 g/dl, con VSG superior a 30 mm/h y con valores de fosfatasas alcalinas superiores a 480 U/l presentaron peor pronóstico que aquellos con hemoglobina superior a 13.5 g/dl, VSG menor de 11 mm/h y fosfatasas alcalinas dentro de los valores normales. Estos hallazgos coinciden con los ya comunicados por Jorgensen y cols. <sup>232</sup>.

Aunque la fosfatasa alcalina es un marcador relativamente inespecífico su elevación en pacientes con carcinoma de próstata está frecuentemente asociada a metástasis óseas <sup>237,366,398</sup>. Nuestros resultados coinciden con los descritos en la literatura: valores séricos elevados de fosfatasas alcalinas se asocian a metástasis óseas y por lo tanto con estadios avanzados, siendo la supervivencia cáncer-específica en estos pacientes inferior.

### 5.1.6.- Fosfatasa Ácida Prostática

Los valores séricos de fosfatasa ácida prostática (PAP) han sido utilizados como marcador bioquímico de enfermedad residual y de recurrencia del cáncer de próstata, principalmente antes del uso generalizado del PSA <sup>411</sup>.

Algunos estudios han comunicado la existencia de una relación significativa entre valores séricos elevados de PAP y la presencia de metástasis óseas <sup>366,472</sup>. Sin embargo, en otras series, aunque el contenido celular de PAP está en relación con el

grado citológico, con el estadio y con la presencia de metástasis, esta relación no es tan lineal para los niveles séricos de PAP <sup>137,207</sup>. Nuestros resultados están en concordancia con estos últimos, no observándose correlación significativa de las cifras de PAP con la presencia de metástasis, con los estadios o con la supervivencia. No obstante, hay que referir que en nuestra serie la PAP no se encontró registrada en los historiales de 38 pacientes.

## 5.2.- HALLAZGOS PATOLÓGICOS CON SIGNIFICADO PRONÓSTICO EN EL CARCINOMA PROSTÁTICO

Son múltiples los parámetros patológicos con trascendencia pronóstica que se barajan en el manejo del carcinoma prostático. Nosotros centraremos la atención en algunos de ellos, aquellos que consideramos que tienen cierta relevancia, o que han sido especialmente estudiados en este trabajo.

### 5.2.1.- Diferenciación histológica

La determinación del grado de diferenciación del carcinoma prostático, expresado en términos de gradación histológica, resulta de máximo interés como dato pronóstico en cualquier tipo de material biopsico, incluido el de procedencia por aguja <sup>46</sup>.

Son numerosos los sistemas de gradación que se han utilizado. Desde el sistema pionero de Broders hace más de 60 años hasta la actualidad, se han empleado con resultados de variable aceptabilidad, al menos 30 sistemas de gradación diferentes <sup>12,46,303</sup>. De todos ellos, los más utilizados y vigentes, son los de la VACURG-Gleason <sup>179,180</sup>, el método de la OMS - variación del sistema de Mostofi <sup>302</sup>, el de Broders y MD Anderson Cancer Center <sup>54,56</sup>, el de Gaeta <sup>162</sup>, y otros como el de Bocking <sup>43</sup> y Helpap <sup>206</sup>. En 1979, la NPCP (Natural Prostatic Cancer Project) en un intento de homogeneizar o estandarizar los diversos métodos de gradación, recomienda la utilización del sistema de Gleason sobre otros <sup>313</sup>.

La clasificación propuesta por Gleason en 1966<sup>179</sup> en 5 grados o patrones histológicos de carcinoma prostático, reconocía ya la posibilidad de existencia de un patrón primario o predominante y otro secundario, siendo la gradación el resultado de la suma de los dos patrones, apreciaciones que fueron ratificadas y estandarizadas posteriormente por la VACURG<sup>180</sup>. Con posterioridad, en 1992, Gleason<sup>181</sup> defiende que el grado histológico suele ser estable en el curso de la enfermedad, lo que justifica el interés pronóstico de su clasificación. En un intento de mejorar el sistema de Gleason, se han propuesto subdivisiones dentro de los patrones principales, de modo que el patrón 3 se subdivide a su vez en A, B y C, y los patrones 4 y 5 en A y B, sin que se conozca con claridad el significado pronóstico de tales subdivisiones<sup>178,303</sup>.

Por otra parte, Mostofi en 1975<sup>302</sup> propone una gradación basada en el grado de anaplasia nuclear, así como en el grado de diferenciación glandular o histológica. Con posterioridad, en 1980, la OMS<sup>305</sup>, asume la clasificación de Mostofi, estableciendo tres grados de anaplasia nuclear (ligera, moderada y marcada) y cuatro grados de diferenciación o maduración glandular del tumor (bien, moderado, pobremente diferenciado e indiferenciado). Recientemente son muchos los trabajos que aceptan el sistema de Mostofi básicamente centrado en el grado de anaplasia nuclear, en parte por su aplicabilidad al terreno citológico<sup>110,205,243</sup>. También actualmente el PUWGPC (Grupo de Trabajo de Patología Urológica del Carcinoma Prostático)<sup>205</sup>, propone un sistema que compagine las dos gradaciones de más uso, como son las de Gleason y el método de Mostofi (OMS), de modo que a los tres grados originales agrega subgrupos A y B, así el grado IA se correspondería con el patrón 1 (Gleason) y grado I (OMS); el grado II A con el patrón 3 y grado II; y los grados II B, III A y III B respectivamente con los patrones 3, 4 y 5 y el grado 3 (OMS). Además, se establecen dos grupos pronósticos: favorable (bajo riesgo) y desfavorable o de alto riesgo (III A, III B y II B con patrón cribiforme).

Por las razones anteriormente comentadas y por su fácil aplicación, nuestro estudio de apreciación del grado histológico, se fundamenta en la gradación mediante

patrones histológicos usando el índice sumatorio de VACURG-Gleason, así como la determinación del grado de anaplasia nuclear siguiendo los criterios de Mostofi (OMS), donde el dato más importante es la valoración del tamaño del nucléolo, tanto central como periférico, a veces múltiple<sup>303</sup>.

Conviene también indicar en lo que se refiere al grado histológico, que no existe un criterio unánime de conversión del "score" de VACURG-Gleason en tres categorías que van de bien a moderada y pobremente diferenciado, o si bien se quiere, bajo, intermedio o alto grado. Para algunos, tumores de bajo grado (bien diferenciados) comprenden las puntuaciones 2, 3 y 4<sup>94,97,257,415</sup>, mientras que para otros lo serían con puntuaciones de 2, 3, 4 y 5<sup>163,303</sup>; el grado intermedio para unos va del 5 al 7<sup>90,93,247,405</sup>, para otros del 6 al 8<sup>163,303</sup>; por último, el alto grado (poco diferenciado), para algunos corresponde con puntuaciones de 8,9 y 10<sup>94,97,257,415</sup>, mientras que para otros serían puntuaciones de 9 y 10<sup>163,303</sup>. Desafortunadamente estos sistemas de condensación de la gradación que parecen bastante operativos, hacen perder significación estadística a la gradación original de VACURG-Gleason<sup>46,181</sup>. Hay que añadir también la problemática de los casos con puntuaciones de 6 y 7 que agrupan la mayoría de los casos, y en los que además se demuestra mayor capacidad agresiva y metastizante con puntuación de 7<sup>46,181,280</sup>. Por ello, Gleason argumenta separar las puntuaciones 6 y 7 como grupo aparte de las formas bien diferenciadas (2,3,4,5) y poco diferenciadas (8,9,10), incluso recomienda en ocasiones establecer 2 grupos: tumores de buen pronóstico (puntuaciones de 2,3,4,5 y 6) y de mal pronóstico (puntuaciones de 7,8,9, y 10)<sup>181</sup>. Montgomery y cols.<sup>298</sup> hablan de bajo grado (puntuaciones de 2-5) y alto grado (puntuaciones 6-10).

En nuestro estudio, la mayor incidencia de carcinomas prostáticos ofrecieron índices sumatorios VACURG-Gleason entre 5 y 7 (Gleason intermedio) con un 72.2 %, cifra que es bastante superponible a las de otras series recientes con un 76 % de los casos<sup>257</sup>, aunque en otros trabajos se informan cifras más bajas con un 45.9 % de los pacientes<sup>97</sup>.

Junto al potencial invasivo y metastizante del tumor, el grado histológico es uno de los más importantes factores pronóstico del carcinoma prostático, relacionándose con otros parámetros tales como volumen tumoral, estadio, incidencia de márgenes afectados y niveles de antígeno prostático específico, entre otros <sup>46,218,257,411,468</sup>.

### 1) Correlación entre grado y volumen tumoral en el carcinoma prostático.

Se ha señalado correlación manifiesta entre la gradación de Gleason y el volumen tumoral <sup>47,52,275,280,472</sup>; así tumores con patrón de Gleason 1 y 2 se asociaban generalmente a tamaños que no superan 1 cc de volumen, mientras que gradaciones de 4 y 5 solían coincidir con tumoraciones casi siempre mayores de 1 cc <sup>78</sup>. El carácter predictivo de progresión de la enfermedad, invasión linfática y estadije queda acrecentado al relacionar grado y volumen de la neoplasia <sup>61,182,219,325,408</sup>.

### 2) Correlación entre grado histológico y localización tumoral

Existen bastantes trabajos que defienden la relación entre localización de cáncer prostático y grado histológico del tumor, de modo que carcinomas de la zona de transición prostática, generalmente originados en nódulos hiperplásicos, suelen coincidir con patrones de Gleason bajos entre 1 y 2; en contrapartida, los carcinomas de la zona periférica, por otra parte más abundantes, suelen ofrecer gradación alta, y por tanto carácter más agresivo comportando peor pronóstico <sup>46,187,274,278</sup>.

### 3) Correlación entre grado histológico y estadios patológicos

Resulta reconocida la utilidad y valor predictivo del grado histológico con respecto a la extensión tumoral <sup>46,47,219,280,303</sup>, llegándose a establecer que puntuaciones de Gleason de 8 o más, implican y sugieren diseminación a ganglios linfáticos <sup>46</sup>. En este sentido, se observa que carcinomas prostáticos en estadio B, en un alto porcentaje de casos ofrecieron puntuaciones de Gleason de 7 o menos ( más del 80%), en contrapartida, estadios C y D fueron propios de tumores moderada y pobremente diferenciados. Nuestros resultados son bastante extrapolables, de modo

que en el estudio todos los casos en estadio A ofrecieron puntuaciones de Gleason por debajo o igual a 7, mientras que en el estadio D, un alto porcentaje de casos coincidieron con puntuaciones por encima o igual a 8 ( sólo hubo un caso de score de 5). También observamos al igual que otros <sup>19,46</sup>, que carcinomas moderadamente diferenciados o de puntuación intermedia (5 a 7), no ofrecieron resultados concluyentes al compararlos con el estadio, ya que indiferentemente se asociaron a estadios B, C y D.

En lo que se refiere al grado nuclear respecto al estadio, en nuestro estudio observamos incidencia relativamente alta de tumores con grado 1 coincidiendo con estadios bajos (A y B) con ausencia de grados 3 en el estadio A. Contrariamente, en estadios altos como C y D , la mayor parte de los casos fueron grados 2 y 3 . En suma, datos todos ellos indicativos de relación del grado nuclear con el estadio tumoral.

#### 4) Correlación entre grado histológico y valores de fosfatasa ácida prostática (PAP) y antígeno prostático específico (PSA)

Se cuestiona por algunos <sup>137,207,334,377</sup> la correlación entre valores serológicos de PAP y PSA, y la gradación primaria de Gleason. Estudios de determinación del PSA y PAP en tejido prostático encuentran relación entre diferenciación celular y contenido celular de PAP y PSA <sup>200,255,311</sup>. Así, en piezas de prostatectomía y mediante técnicas inmunohistoquímicas, el estudio semicuantitativo demuestra disminución de la tinción para el PAP en los tumores más agresivos <sup>29,396,468</sup>, y dado que el PSA se considera más selectivo que el PAP como marcador tumoral <sup>410</sup>, trabajos posteriores <sup>411</sup> demuestran que el PSA y PAP en tejido prostático ( obtenido mediante aguja) se correlacionaban con el grado citológico.

#### 5) Correlación del grado histológico con progresión de la enfermedad y supervivencia de los pacientes

Parece existir una marcada relación entre grado de diferenciación del carcinoma

prostático y parámetros referidos a la supervivencia y recurrencias, incluyendo supervivencia cruda, intervalo libre de enfermedad postratamiento y supervivencia libre de metástasis, entre otras <sup>41,46,55,128,216,380,472</sup>.

En análisis univariante y multivariante, se demuestra que el "score" de Gleason se relaciona con progresión de la enfermedad y supervivencia de los pacientes <sup>257</sup>. En este sentido, apuntan las observaciones de Humphrey y cols <sup>216</sup>, que señalan que la gradación de Gleason resulta ser el factor más importante de predicción de recurrencias tras prostatectomía. Sin embargo, hay autores que encuentran difícil la valoración del grado de independencia del grado histológico a efectos predictivos en análisis multivariante a no ser en concurrencia con otros parámetros tales como la extensión tumoral <sup>218,219</sup>. Recientemente Lieber y cols <sup>257</sup> encuentran que la supervivencia a los 10 años es del 94 % para el Gleason bajo (2-4), 88% para el intermedio (5-7) y 56% para el alto. Cifras algo más óptimas, que las que utilizan otras clasificaciones como la del Anderson Cancer Center, que informan supervivencias a los 5 años del 91% para el grado 1, 60% para los grados 2 y 3 y 15 % para el grado 4 <sup>54</sup>. También se informa aumento de la tasa de mortalidad conforme se incrementa el grado nuclear del tumor <sup>198</sup>.

Por último, indicar que Schroeder y cols <sup>206,382,383</sup> encuentran que en la supervivencia inciden datos patológicos más concretos que la diferenciación tumoral, como pueden ser: la arquitectura glandular, forma y tamaño nuclear, así como el índice mitótico.

### 5. 2. 2.- Volumen tumoral

El grupo de McNeal y cols <sup>274,275,277</sup>, ha prestado especial interés al estudio del significado pronóstico del volumen tumoral en el carcinoma prostático, de modo que establecen que tumores por debajo de 4 ml (cc) tienen bastantes garantías de no presentar penetración capsular, invasión de vesículas seminales, o ganglios linfáticos y margen quirúrgico positivos; mientras que tumores por encima de 11 cc conllevan

afectación de las estructuras anteriormente mencionadas. A conclusiones similares llegan otros<sup>194,343,408,354,446</sup>, que indican además correlación del tamaño tumoral con el grado histológico y estadio. Con todo, hay que tener en cuenta que tumores menores de 3 cc pueden penetrar en la cápsula prostática e invadir la vesícula seminal<sup>81,96</sup>.

Mostofi y cols<sup>303</sup> informan invasión de la vesícula seminal y extensión extraprostática en tumores por debajo de 1.35 c.c. de volumen, mientras que por el contrario, hay casos de tumores grandes intraprostáticos que no se propagan fuera de la próstata ni dan metástasis ganglionares linfáticas; en este sentido, se describen casos de tumores prostáticos de hasta 26 cc sin metástasis ganglionares linfáticas<sup>194</sup>.

En definitiva, se aconseja la especificación del volumen tumoral prostático<sup>205</sup>, si bien como ya hemos observado, no está del todo estandarizado el volumen en piezas de prostatectomía, por lo que parece resultar más práctico estimar el porcentaje de cáncer con respecto al total de la pieza<sup>46</sup>.

### 5. 2. 3.- Necrosis tumoral

Basándonos en el significado pronóstico adverso de la necrosis en neoplasias de otras localizaciones, tales como como la mama<sup>140</sup> y carcinoma colorrectal<sup>38</sup>, nos planteamos la valoración del fenómeno en el carcinoma prostático. Sabido es que ciertos tipos de necrosis focal son un hallazgo consustancial con neoplasias prostáticas de patrón de Gleason alto o poco diferenciado, como ocurre en el patrón comedocarcinomatoso<sup>12,181,347</sup>; sin embargo, nosotros consideramos la necrosis tumoral como fenómeno aislado o independiente del patrón histológico, de modo que apreciamos un tipo de necrosis masiva o difusa, o de necrosis focal, bien de tipo comedocarcinomatoso ( grado 5 de Gleason) o no comedocarcinomatoso. Comprobamos que la presencia de necrosis en el tumor al margen del patrón o grado de Gleason o de su distribución (focal o difusa), constituyó un hallazgo que se asociaba a grados nucleares y patrones histológicos altos ( parámetros de significado pronóstico

desfavorable o adverso) dato que fue estadísticamente significativo ( $P < 0.0001$ ). En este trabajo, también observamos que el signo de necrosis tumoral en todas sus formas, fue un hallazgo que repercutió de modo significativamente desfavorable en la supervivencia de nuestros pacientes con carcinoma prostático.

En estudios previos sobre carcinomas de colon y de recto<sup>38</sup>, se ha observado que cuando al dato patológico de necrosis tumoral se suman otros tales como respuesta linfoide del estroma nula o escasa, el fenómeno repercutía desfavorablemente en la supervivencia de los pacientes, resultado estadísticamente significativo ( $p < 0.00046$ ). Lo que demostraba que la combinación de datos patológicos puede potenciar el significado pronóstico de la necrosis, hecho que no apreciamos en el presente trabajo.

#### 5. 2. 4.- Infiltrado linfoide del estroma tumoral

En neoplasias malignas epiteliales de localizaciones tales como el colon, recto y tracto urinario, se admite que la existencia de un denso infiltrado linfoide del estroma y/o tejido peritumoral, representa un signo de buen pronóstico, independientemente de otras variables patológicas<sup>38,271</sup>. Dicho infiltrado inflamatorio en distintos tipos de órganos, se ha interpretado como una respuesta inmune del huésped contra el tumor<sup>271</sup>.

Desde hace cierto tiempo, algunos autores han prestado especial atención al infiltrado linfoide de tipo crónico en biopsias prostáticas, al que variablemente han atribuido un origen infeccioso o autoinmune<sup>41</sup>. Fenómeno por otra parte bastante frecuente, llegándose a describir hasta en el 98% de piezas de prostatectomía por hiperplasia benigna<sup>240</sup>, pero lo que es más interesante, un grado variable de prostatitis crónica se aprecia hasta en un 75% de las próstatas como hallazgo incidental de autopsias de tipo forense<sup>32</sup>. Blumenfeld y cols<sup>41</sup> utilizando criterios más rigurosos y metódicos sobre la intensidad del infiltrado inflamatorio (1 ó más agregados de linfocitos con un diámetro al menos entre 7 y 10 células), demostraron prostatitis

linfática que variaba entre el 44% de biopsias por punción y el 100% con piezas de prostatectomía. Al igual que McClinton y cols <sup>271</sup>, demuestran que la mayor parte del infiltrado linfoide es de tipo T - CD - 3 positivo, autores estos últimos que a su vez apreciaron que no eran linfocitos convenientemente activados ( estado de HLA - DR y receptor IL - 2 ), y por tanto, no sugestivos de respuesta específica del huésped contra antígenos tumorales. Tampoco se demuestra que la presencia o ausencia de prostatitis incida de forma distinta en casos de carcinoma, si bien se resalta variabilidad en cuanto a la distribución del infiltrado linfoide en las glándulas neoplásicas con respecto a los casos con enfermedad benigna de la próstata o incluso lesiones precursoras tipo PIN, en el sentido de que en glándulas francamente neoplásicas, el infiltrado linfoide no es intraepitelial, y por tanto, respeta a las células neoplásicas, hallazgo que también observamos en este estudio. Tales hechos ponen en evidencia diferencias antigénicas entre células neoplásicas con respecto a células epiteliales benignas e incluso displásicas <sup>41</sup>, lo que permite también especular que las células auténticamente neoplásicas son las que parecen escaparse de la vigilancia inmunológica <sup>41</sup>. A nuestro juicio, dichas observaciones son muy interesantes, aunque requieren estudios más minuciosos avalados con casuísticas más amplias así como mayor número de trabajos.

#### 5. 2. 5.- Invasión capsular o periprostática

Para establecer el significado clínico-patológico de la invasión capsular prostática, es necesario puntualizar una serie de conceptos. En primer lugar, que lo que se conoce como cápsula prostática es en realidad una banda de tejido fibromuscular de disposición concéntrica, que no está presente en el apex de la próstata <sup>218</sup> y aparece mal definida anteriormente y cerca de la base o región proximal de la glándula <sup>11,12,18,303</sup>.

En segundo lugar, está la conveniencia de precisar términos tales como: extensión o contacto del tumor con la cápsula ( 20% de los casos ), infiltración o invasión de la cápsula sin atravesarla ( 35 % de los casos ), y penetración, transgresión o perforación, con extensión más allá de la cápsula ( 16% de los casos) <sup>12,61,218,303</sup>. Al parecer, la invasión dentro de la cápsula no tiene interés clínico-patológico <sup>11,218</sup>, lo que

tiene verdadera importancia es la perforación o extensión del tumor al tejido fibroadiposo periprostático<sup>11,218</sup>, y es a ello, a lo que nos referiremos cuando hablamos de invasión capsular prostática. Por tanto, a aquellos casos donde se demuestra presencia de acinos neoplásicos en el tejido fibroadiposo que rodea a la próstata (nos sirve de referencia el que dentro de la próstata no hay tejido adiposo) y / o en contacto con células nerviosas ganglionares<sup>28,303</sup>. Parece ser que la invasión capsular prostática por el carcinoma es un fenómeno bastante frecuente, y que en muchos de los tumores referidos como neoplasias intraprostáticas, en cortes seriados se demuestra extensión extracapsular<sup>61,193,252,325</sup>, por lo que en piezas de prostatectomía se aconsejan secciones con intervalos no inferiores a 5 mm<sup>194</sup>.

La invasión capsular prostática debe ser señalada a efectos de estadije clínico y manejo del paciente, al ser un dato reconocido como parámetro de progresión y pronóstico de la enfermedad<sup>28,49,61,194,303</sup>; con todo, hay quienes defienden que la perforación tumoral de la cápsula prostática, no influye en las recurrencias y supervivencia de los pacientes<sup>184</sup>.

Se informa que la invasión periprostática se relaciona con parámetros pronósticos adversos, de modo que se correlaciona con cifras elevadas de PSA (> 0.23 mg/ml), volumen tumoral, grado de diferenciación de Gleason e invasión de la vesícula seminal<sup>49,218</sup>. Nosotros sólo añadiremos, que en el presente trabajo y en piezas de prostatectomía todos los tumores aneuploides presentaron invasión capsular, como posible dato que relaciona el fenómeno con resultados de análisis de ADN por citometría de flujo. Por otra parte, es de destacar que en nuestro estudio, la invasión capsular prostática fue un parámetro pronóstico con significado estadístico.

## 5. 2. 6.- Invasión tumoral de la vesícula seminal

Es generalmente reconocido el valor pronóstico de la invasión de la vesícula seminal por el carcinoma prostático, hallazgo que suele constituir un índice de mal pronóstico<sup>49,218,446</sup>, por lo que la presencia de este fenómeno debe de ser referida y

buscada, prestando debida atención a los cambios involutivos de la vesícula seminal, que pueden conducir a confusión con invasión por el carcinoma prostático<sup>303</sup>. La invasión tumoral de la vesícula seminal (tejido perivesicular, estroma y/o músculo) implica un alto riesgo de recurrencia y progresión del cáncer prostático, hecho que se hace evidente en más del 50% de los casos<sup>184</sup>. Al respecto, también se indica que el fenómeno de la invasión microvascular de la vesícula seminal, hallazgo que se llega a describir en el 57% de los casos<sup>184</sup>, constituye un dato predictivo de progresión tumoral y de presencia de ganglios linfáticos invadidos<sup>184</sup>.

En relación con otros parámetros de interés pronóstico, se informa que la invasión tumoral de la vesícula seminal junto con la perforación capsular prostática implican un pronóstico desfavorable<sup>218,303,446</sup>, encontrándose además correlación con el volumen tumoral (> 4 cc) y metástasis ganglionares linfáticas<sup>218,446</sup>. En este sentido, se señala que la invasión tumoral de la vesícula seminal en análisis multivariante constituye un factor pronóstico independiente al igual que otras variables como los valores de PSA, puntuación de Gleason, porcentaje de cáncer en biopsia, ganglios linfáticos invadidos, y en definitiva progresión tumoral<sup>49,184</sup>. Sin embargo, abundan los trabajos que cuestionan su valor pronóstico predictivo e independiente, indicándose que la invasión neoplásica de la vesícula seminal no tienen valor predictivo independiente de datos tales como estado de los ganglios linfáticos, grado histológico y volumen tumoral<sup>49,184,218</sup>.

#### 5. 2. 7.- Invasión perineural, vascular y linfática

Si bien resulta indiscutible que la propagación perineural es un signo de invasión tumoral, son más cuestionables algunos aspectos tales como la correcta interpretación del fenómeno, e incluso su significado pronóstico<sup>28,218,303</sup>.

De este modo, se señala que los espacios perineurales no son canales linfáticos<sup>363</sup>, por lo que es más aceptable hablar de invasión perineural o invasión de espacios perineurales<sup>303</sup>. El fenómeno es bastante frecuente, así en muestras tisulares adecuadas, se describe invasión perineural hasta en un 90% de los casos<sup>61</sup>, aunque

hay que tener cautela en su apreciación, ya que las glándulas neoplásicas pueden estar muy próximas o comprimidas contra los trayectos nerviosos, sin que ello signifique invasión, es la que se denomina "indentación perineural", y que se caracteriza por presentar interposición de membrana basal entre acinos y nervios, o que los acinos o glándulas neoplásicas rodeen circunferencialmente (total o parcialmente) a las raíces nerviosas<sup>116,303</sup>. En este trabajo, que reúne un grupo heterogéneo de procedimientos biopsicos (punciones, resecciones transuretrales y prostatectomías), sólo se pudo demostrar invasión perineural en algo más del 58 % de los casos.

Resulta discutible por algunos el significado clínico de la invasión perineural dentro de la próstata, aunque sí parece de interés el que el fenómeno se aprecie en el tejido periprostático<sup>252</sup>. En este sentido, estudios mediante biopsias de punción prostática, encuentran correlación entre medición del grado de invasión perineural y penetración capsular, particularmente cuando el hallazgo se hace evidente en vecindad a la cápsula prostática<sup>28,205</sup>. El hecho parece tener interés en el momento de adoptar una decisión terapéutica ante la prostatectomía, valorándose la conveniencia de si junto a la pieza se debe o no reseca el paquete neurovascular o bandeleta, con el fin de intentar conservar una adecuada actividad sexual en el paciente<sup>28,205</sup>.

Con todo, y en líneas generales, la invasión perineural no se considera de importancia pronóstica<sup>218</sup>, aunque en algunos informes se señala asociación con un peor pronóstico<sup>218</sup>.

No tenemos referencia de trabajos que hagan un estudio selectivo sobre el valor o significado pronóstico de la invasión tumoral de vasos sanguíneos y linfáticos en biopsias prostáticas. En parte, porque en biopsias por aguja y resección transuretral resulta difícil el reconocimiento del fenómeno, generalmente por artefactos consecutivos a la cauterización y aplastamiento por compresión de los tejidos<sup>303</sup>. Puede servir de orientación el dato de que los capilares suelen estar en íntimo contacto con los acinos glandulares prostáticos, mientras que los canales linfáticos se presentan aislados y dispersos por el estroma prostático<sup>161</sup>. Cabe esperarse, que todas aquellas técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas que resaltan la tinción de constituyentes de las

paredes vasculares, tales como membrana basal y fibras elásticas, puedan contribuir a mejorar y precisar la valoración del fenómeno de la invasión vascular.

### 5. 3.- ANÁLISIS DEL ADN EN EL CARCINOMA PROSTÁTICO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

#### 5. 3. 1.- Generalidades con especial referencia a la utilidad de la ploidía del ADN en el carcinoma prostático

La citometría de flujo (CF) aplicada en tumores sólidos al estudio del contenido de ADN en células neoplásicas, nos proporciona dos tipos de datos de reconocido interés pronóstico; por un lado, la ploidía de ADN en el tumor, y , por otra parte, la tasa de proliferación celular, que viene expresada por el índice proliferativo o fracción celular en fase de síntesis ( fase S) del ciclo celular.

En lo que se refiere al primer punto o aspecto, el análisis de ADN en tumores mediante CF, representa un procedimiento morfométrico, que nos permite detectar la presencia de poblaciones celulares con anormal contenido en ADN (aneuploides), lo que traducido a un histograma (que refleje número de células y su contenido en ADN) se expresa como un pico anormal. La relación o ubicación de dicho pico anómalo en el histograma, con respecto al pico generado por la fracción celular en reposo (G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>) de una población de células normales (diploides) viene indicada por el índice de ADN, que será de 1 cuando coincidan ambos picos (diploidía), o mayor de 1 (aneuploides hiperdiploides), cuando el pico aneuploide no coincide con el pico G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> de una población normal diploide por contener mayor cantidad de ADN; de este modo, un índice de ADN=2 nos señala que el pico o población normal tiene el doble de ADN (tetraploide) que el de una población celular normal diploide, y por tanto, se encuentra desplazada en el histograma el doble de distancia (concentración de ADN expresada en canales) con

respecto al pico generado por una población normal <sup>96,107,165,302,444,460</sup>.

Conviene resaltar, que el análisis de ADN mediante citometría de flujo de las neoplasias en general, no ofrece resultados uniformes en cuanto a utilidad pronóstica. En este sentido, Koss y cols <sup>242</sup> revisaron en la literatura diferentes tipos y localizaciones orgánicas de tumores con estudio de CF, apreciando que la determinación de la ploidía tumoral ofrecía significado pronóstico diverso, de modo que carcinomas diploides de vías urinarias ( uroteliales ), prostáticos, endometriales y ováricos, ofrecían muy buena correlación con pronóstico favorable no observándose resultados tan satisfactorios en el carcinoma colorrectal, sarcomas, tumores de células germinales y tumores cerebrales; incluso se apreció escaso o nulo valor pronóstico en la determinación de la ploidía de carcinomas pulmonares, tiroideos y gástricos, entre otros (TABLA II). Más concretamente, trabajos dentro del terreno de la oncología urológica (carcinoma transicional de vejiga, carcinoma renal y prostático) reflejan un reconocido significado pronóstico a la determinación de la ploidía del ADN <sup>442</sup>.

La importancia pronóstica de la determinación de la ploidía del ADN en el carcinoma prostático, queda refrendada por gran cantidad de publicaciones <sup>42, 97, 98, 134, 135, 143, 193, 201, 230, 257, 263, 298, 312,316, 345, 347, 359,412, 416, 429, 458, 466, 467</sup>. El grupo de Lieber, Myer y Blute del Departamento de Urología de la Clínica Mayo en estudios de revisión de casos de piezas de prostatectomía <sup>298,314,316,466,477</sup> informa que en pacientes con estadios patológicos B, C y D de tumor, la determinación de la ploidía del ADN tiene estrecha relación con la progresión de la enfermedad y la supervivencia. Sin embargo, existe controversia sobre la precisión de la ploidía como variable pronóstica independiente <sup>97,98,201,218,260,359</sup>. Con todo, trabajos recientes defienden que la determinación de la ploidía del ADN en el carcinoma prostático constituye una importante variable pronóstica independiente, pero en sinergia con el grado histológico <sup>7,143,272,294,416</sup>. Cabría también comentarse, que hay autores que no encuentran relación de la aneuploidía con la progresión de la enfermedad o con el pronóstico <sup>218,230</sup>. De hecho, Jones y cols <sup>230</sup> señalan que la detección de la aneuploidía, puede carecer de

utilidad porque el fenómeno suele ser un evento tardío en la progresión de la enfermedad.

Dentro de la aneuploidía, conviene resaltar que la tetraploidía (índice de ADN:1.9-2.1), no influye tan desfavorablemente en la evolución del proceso, ofreciendo pronóstico intermedio entre formas aneuploides y diploides<sup>298</sup>. De hecho, en algunos estudios no se reflejan diferencias sustanciales en cuanto al pronóstico de carcinomas tetraploides y diploides<sup>144,298,432</sup>. Nuestros resultados concuerdan o apuntan hacia esta posibilidad, de forma, que los 5 casos de tetraploidía del estudio coincidieron con grados histológicos relativamente bajos (todos los casos presentaron puntuación 6 de VACURG). Hubo menos significación de nuestros resultados en la comparación de la tetraploidía con el grado nuclear, de modo que se presentó con similar incidencia en grados 1 y 2, aunque ninguno de los casos fue grado 3.

Se acepta que los tumores multiploides o con varias poblaciones celulares aneuploides son las que conllevan peor pronóstico<sup>432</sup>. En nuestro estudio sólo detectamos un caso de multiploidía que coincidía con un tumor que ofrecía grado nuclear 2 e índice sumatorio alto (puntuación de 8). También reseñamos la rareza de la hipodiploidía (índice de ADN menos de 1) que se presentó en un caso que ofrecía grado nuclear de 2 e índice sumatorio relativamente bajo (puntuación de 6).

Para establecer la exacta incidencia de aneuploidía en el carcinoma de próstata, debemos tener en cuenta la nomenclatura generalmente poco uniforme que se ha aplicado a los tumores con anormal contenido de ADN. Así, se han subdividido los tumores en diploides, tetraploides y aneuploides no tetraploides<sup>4,303,411,435</sup>. En otros trabajos se habla de hiperdiploidía, triploidía y tetraploidía<sup>415</sup>. Dado que la tetraploidía es en realidad también una forma de aneuploidía (a pesar de su comportamiento biológico más favorable), nos parece más adecuada la designación de aneuploidía tetraploide y no tetraploide<sup>6</sup>. De este modo, se cifra la incidencia de aneuploidía entre 42 y 90% de los casos, según se trate de tumores bien o pobremente diferenciados<sup>303,435</sup>. Algunos autores refieren porcentajes de aneuploidía más bajos con un 32%<sup>298,331</sup>, incluso

nosotros obtuvimos incidencia más baja con un 23%. Dicha diferencia de resultados en nuestro trabajo, no parece ser achacable al método empleado, así el número de células de cada muestra tumoral ( particularmente en cilindros por punción) se encontraba por encima del número mínimo exigible de núcleos celulares (>2500) y el recomendable de 20000<sup>46,298</sup>. Sin embargo, tales variaciones de incidencia en los distintos trabajos de CF, pueden obedecer a que en los histogramas de poblaciones pequeñas las células aneuploides pueden ser solapadas por células normales o malignas diploides. También hay que tener en cuenta la posibilidad de que histogramas de casos con coeficientes de variación altos ( por encima de 7, como ocurrió en algunos de nuestros casos) puedan enmascarar poblaciones tumorales aneuploides cercanas a la diploidía o tetraploidía<sup>96</sup>. Al respecto, y como comentaremos posteriormente, la combinación de estudios de CF con la de citometría estática o de imagen (CI) puede aumentar la especificidad de resultados de la determinación de la ploidía de ADN<sup>194,442</sup>. También puede ser un problema de muestreo, así, algunos<sup>194</sup> indican que la posibilidad de detectar aneuploidía en una sola muestra o espécimen biopsico ( algunos de nuestros casos) es relativamente bajo (< 30%), por lo que se establece que una o incluso dos biopsias preoperatorias pueden considerarse insuficientes para descartar la aneuploidía<sup>194</sup>.

A grandes rasgos, el análisis de ADN mediante CF en el carcinoma prostático nos puede dar la siguiente información:

1) Distinción entre condiciones benignas y malignas de la próstata<sup>19,436</sup>. No obstante hay que matizar que lesiones benignas tales como la hiperplasia de la próstata pueden en ocasiones expresar aneuploidía<sup>260,303,359,435</sup>, de hecho, en áreas de hiperplasia adyacentes a carcinomas de próstata, se describe aneuploidía con gran frecuencia<sup>96</sup>. En cualquier caso, aunque de forma genérica, la detección de aneuploidía refuerza el diagnóstico de malignidad<sup>19</sup>.

2) Se señala buena correlación de la ploidía del ADN con el grado nuclear, grado histológico de diferenciación y estadio clínico-patológico<sup>19,39,97,257</sup>. Sin embargo, hay que tener en cuenta inconvenientes, como el reconocimiento de la heterogeneidad de

poblaciones celulares, particularmente en tumores grandes, lo que podría requerir numerosas biopsias para garantizar que no se nos escapen al análisis grupos de poblaciones tumorales aneuploides <sup>134,194, 263</sup>. Hay que considerar también la posibilidad en el tiempo que el tumor sufra desdiferenciación y cambio de la ploidía <sup>96</sup>. En este sentido, hay estudios de seguimiento de pacientes en un periodo de 24 meses, comprobándose como tumores inicialmente diploides se convertían en aneuploides <sup>6</sup>, indicándose que la tasa anual de transformación ronda hacia al 9% <sup>435</sup>. El modelo de progresión, establece que cánceres diploides se transforman en tetraploides y algunos subsecuentemente pasan a aneuploides <sup>96</sup>. De este modo, se han señalado 2 modelos o grupos de comportamiento biológico en el curso del carcinoma prostático; un grupo de casos que permanece inalterable, y un segundo grupo de tumores inicialmente bien diferenciados, que con el tiempo se hacen poco diferenciados <sup>433,462</sup>.

3) La combinación de la evolución de la ploidía del ADN tumoral con otros parámetros morfológicos ( grado histológico) puede arrojar información predictiva de progresión local de la enfermedad o de metástasis <sup>19,39,257</sup>.

4) La citometría de flujo aplicada al análisis de ADN en el carcinoma prostático, resulta un buen parámetro para el estudio de la evolución y manejo terapéutico de la enfermedad <sup>19,205</sup>. Existen trabajos que sostienen el valor de la ploidía en la evolución del proceso, tanto con tratamiento activo <sup>423,466</sup> como en casos sin tratar <sup>4</sup>. Es reconocido que tumores prostáticos aneuploides generalmente resultan insensibles a la radioterapia externa <sup>257,403</sup> y que tumores diploides en estadio D responden relativamente mejor al bloqueo hormonal androgénico. Incluso, en caso de tratamiento hormonal antitumoral, se han comprobado cambios hacia la aneuploidía conllevando peor pronóstico, salvo los casos de tetraploidía. Se sugiere que tales fenómenos de transformación de la ploidía llegan a preceder en el tiempo a los cambios citológicos <sup>6</sup>.

5) Parece existir una buena correlación entre ploidía del ADN y supervivencia <sup>205,257,416</sup>, de modo que los tumores diploides se relacionan con mayor supervivencia de los pacientes que las neoplasias aneuploides, particularmente en las formas no

tetraploides.

6) Por último, la progresión de la enfermedad, entendida como su capacidad de desarrollar recidivas locales y sistémicas, guarda relación con la ploidía <sup>257,298</sup>. Se informa que todos los tumores evidencian capacidad de progresión pese al tratamiento <sup>298</sup>. Más concretamente, pacientes en estadio B con Gleason intermedio experimentaron progresión en el 20% de los casos a los 10 años, frente a un 60% de los casos con tumores aneuploides <sup>257</sup>.

Como hemos comentado, son bastantes las ventajas que aporta el análisis de ADN de tumores prostáticos, sin dejar de reconocer que la ploidía del ADN tiene un significado pronóstico más débil que otros parámetros patológicos como son la extensión tumoral y el grado histológico de Gleason; sin embargo, hay tendencia en muchos laboratorios de EEUU de introducir el análisis de ADN de tumores (parafinados y fijados en formol) por CF, dentro de la rutina del manejo patológico de carcinomas prostáticos <sup>39,218,257</sup>. Al respecto, recientemente el Grupo de Trabajo sobre Cáncer Prostático (XXVI Conferencia del Colegio de Patólogos Americanos), ha establecido en el carcinoma prostático una clasificación en 3 grupos de los factores pronóstico de acuerdo con su importancia y relevancia clinicopatológica, de modo que se considera que la ploidía de ADN se coloca por orden de importancia, inmediatamente por detrás de parámetros pronósticos fundamentales y bien establecidos (estadio, grado histológico de Gleason y antígeno prostático específico), y por delante del resto (morfométricos, biológicos, moleculares, etc.). En suma, recientemente la Conferencia de Concenso de Citometría del ADN, una vez revisada la literatura, establece con bastante prudencia, que a consecuencia de cierta variabilidad de los resultados del análisis de la ploidía del ADN (particularmente por citometría de imagen), tales estudios no parecen arrojar suficientes garantías, como para introducirlas en la rutina del manejo clinicopatológico del carcinoma prostático <sup>46</sup>.

A continuación pasaremos a comentar con más detalle la relación existente en el carcinoma prostático, entre datos obtenidos mediante análisis de ADN y parámetros

de reconocido valor pronóstico.

### 5.3.2.- Ploidía del ADN y extensión tumoral

Son numerosos los trabajos que informan correlación entre ploidía y estadio o categoría T del tumor <sup>6,96,134,201,230,257,260,298,411,433</sup>.

En lo que se refiere al estadio patológico o clinicopatológico, de forma general se señala que tumores en bajo estadio suelen ser diploides y en alto estadio aneuploides <sup>6,462</sup>. Más concretamente, en el estadio A la mayoría de los carcinomas prostáticos son diploides <sup>241,416</sup>, incluso en el estadio B <sup>19,154</sup>, se llega a informar un 93.7% de diploidías <sup>97</sup>. En cualquier caso, la incidencia de diploidía en estadio B se encuentra en un punto intermedio entre el estadio A y los estadios C y D. En los estadios C y D, se dan por igual la cantidad de tumores diploides y aneuploides <sup>19,154</sup>, y con bastante representatividad las formas aneuploides tetraploides. En el estadio D2 (con metástasis distantes) los carcinomas prostáticos son predominantemente aneuploides con un 72% de los casos <sup>97,154</sup>.

Al respecto del estadije dando designación o categoría de extensión tumoral T1, se indica que la incidencia de tumores diploides decrece exponencialmente con el incremento del estadio, siendo raros los tumores diploides en estadio T4, y que en contrapartida, la incidencia de aneuploidías no tetraploides aumenta exponencialmente con el estadio <sup>6,96,303,435</sup>. Los tumores aneuploides tetraploides son raros en el estadio T1, y ofrecen máxima incidencia en estadios T2 y T3 <sup>433</sup>. Como se observa, la determinación del estadije tanto por el sistema ABCD como por el T, ofrece resultados perfectamente superponibles al compararlos con la ploidía del ADN.

En cuanto a la ploidía en relación con aspectos particulares de la extensión tumoral, cabe indicarse la notoria asociación de la aneuploidía con la penetración o infiltración de la cápsula prostática <sup>97,194</sup>. De este modo, se señala invasión de la cápsula prostática en el 96% de los carcinomas prostáticos aneuploides, frente al 57%

de los diploides, lo que resulta estadísticamente significativo ( $p < 0.0001$ )<sup>194</sup>. Con todo, hay informes que no reflejan diferencias en cuanto a penetración capsular entre tumores prostáticos diploides y aneuploides<sup>42,186</sup>, quizás por ser insuficiente el número de casos analizados en los estudios<sup>194</sup>. En relación con estructuras anexiales adyacentes a la próstata, también se señala invasión de la vesícula seminal en el 75% de los carcinomas prostáticos aneuploides<sup>194</sup>. En el presente trabajo que no recoge un número importante de piezas de prostatectomía, nuestros resultados son sugerentes de que la aneuploidía se relaciona con invasión capsular, ya que en el 100% de los carcinomas prostáticos aneuploides se demostró penetración o invasión capsular prostática, frente al 14. 2% de tumores diploides.

En este estudio, la determinación de invasión perineural en cilindros prostáticos y biopsias de RTU, resultó un fenómeno azaroso y condicionado al tipo y tamaño de la muestra remitida, aunque no apreciamos diferencias entre tumores diploides y aneuploides. Las piezas de prostatectomía aportaron más material de estudio, si bien el número de casos fue reducido (9 piezas), aunque en todos los casos de tumores aneuploides se demostró invasión perineural, frente al 28.5% de los casos de tumores diploides.

En lo que se refiere a la propagación del tumor a distancia, hay que resaltar que la presencia o ausencia de metástasis, constituye el factor pronóstico más importante en el momento de establecer perspectivas de supervivencia<sup>35,172</sup>. En líneas generales, se señala que los tumores diploides prostáticos con escasa frecuencia metastatizan<sup>354</sup>.

En un estudio retrospectivo<sup>466</sup> de pacientes con seguimiento entre 5 y 19 años, se observó que el 15% de los carcinomas diploides prostáticos presentaron metástasis, frente al 75% de los casos con tumores aneuploides, dándose la peculiar circunstancia de que ninguno de los casos con neoplasias diploides había fallecido. Más concretamente, en estudios radiológicos con scanning óseo, se informa que la incidencia de metástasis para tumores diploides, tetraploides, aneuploides no tetraploides y

multiploides fue respectivamente de 7%, 17%, 25% y 52% de los casos<sup>347</sup>.

### 5. 3. 3.- Ploidía del ADN y grado de diferenciación tumoral

Hay numerosos trabajos que correlacionan la ploidía del ADN de carcinomas prostáticos mediante CF con la diferenciación tumoral, tanto en términos de grado de diferenciación citológica<sup>4,6,133,434</sup> como de grado de diferenciación histológica<sup>19,35,97,134,143,230,257,260</sup>. El grado citológico de diferenciación es bastante superponible al sistema de gradación nuclear de anaplasia en 3 categorías, que ya hemos empleado<sup>303,304</sup>.

En lo que se refiere al grado histológico, no vamos a entrar en disquisiciones previamente comentadas, sobre equivalencias del grado de diferenciación ( bien - moderado - pobremente diferenciado ) con el tipo de puntuación según el sistema de VACURG- Gleason. Nosotros, siguiendo los criterios de Mostofi<sup>303</sup>; observamos que en nuestro estudio, la aneuploidía no se presentó en formas bien diferenciadas o con puntuación por debajo de 6, dato coincidente con Montgomery y cols.<sup>298</sup>, lo que es bastante aproximado a la opinión de otros<sup>19,97,143</sup>, que indican que los tumores aneuploides se asocian a puntuaciones o "scores" por encima de 6, mientras que los tumores prostáticos diploides lo hacen con puntuaciones de 6 ó menos, estableciéndose puntuaciones promedio de VACURG - Gleason de 8.2 para los tumores aneuploides, y puntuaciones promedio de 5.5 para los tumores diploides. En este sentido, se señala buena correlación entre el alto grado de malignidad y aneuploidía, sin embargo no se encuentra relación para grados intermedios<sup>19,263</sup>. No obstante, recientemente Lieber y cols<sup>257</sup> en una extensa revisión de casi 500 casos de prostatectomía, informan que la determinación de la ploidía del ADN, es especialmente útil en el Gleason intermedio (5 a 7), de modo que los tumores con dicha gradación diploides ofrecen mejor pronóstico que los aneuploides. En suma, la combinación de la ploidía con el grado histológico ayuda a predecir los tumores que pueden progresar localmente o metastatizar<sup>19,257</sup>.

Aunque hay trabajos en los que no se refleja relación de la anaplasia tumoral con el incremento de la aneuploidía<sup>39</sup>; predominan los informes que establecen que tumores prostáticos bien diferenciados o de bajo grado tienden a ser diploides, mientras que los pobremente diferenciados suelen ser aneuploides<sup>133,134,205,230,298,411,462</sup>. Al respecto, se señala que tumores bien diferenciados son fundamentalmente diploides y tetraploides, con un 90% de los casos, mientras que tumores moderadamente diferenciados ofrecen aneuploidía entre el 34 y 50% , y tumores pobremente diferenciados dan cifras de aneuploidía entre el 67 y 100% de los casos<sup>133,205</sup>.

#### 5.3.4.- Ploidía del ADN y volumen o tamaño tumoral

Existen informes que ponen en relación el volumen o tamaño del carcinoma prostático con el tipo de ploidía del ADN<sup>96,134,194,201,230,298</sup>, hasta el punto de considerarse que los resultados de análisis de ADN mediante CF pueden ser predictivos del volumen tumoral<sup>95</sup>. Recientemente Haggman y cols.<sup>194</sup> observaron que tumores prostáticos mayores de 12 cc ofrecían aneuploidía hasta en el 87.5% de los casos, mientras que entre 8 y 11 cc, la cifra de porcentaje bajaba al 50%, llegando al 18% en volúmenes por debajo de 2 cc. Curiosamente un año antes que los autores anteriores, Deitch y cols.<sup>96</sup> informaron que volúmenes tumorales mucho más reducidos se correlacionaban con aneuploidía, de modo que carcinomas prostáticos con más de 1 cc de volumen fueron todos aneuploides, mientras que la diploidía era propia de tumores por debajo de 0.4 cc de volumen, aportando este trabajo la observación adicional, de que la aneuploidía también se presentaba en el tejido adyacente o peritumoral, incluso en relación con volúmenes tumorales intermedios entre 0.4 y 1 cc. Quizás esta discrepancia en cuanto a cifras de volumen tumoral y aneuploidía entre dichos trabajos, pudiera radicar en que Deitch y cols.<sup>96</sup> utilizan criterios más estrictos, describiendo tumores anormalmente diploides o formas intermedias entre neoplasias diploides y aneuploides, que igualmente aumentaban su incidencia conforme se incrementaba el volumen tumoral.

### 5.3.5.- Ploidía del ADN tumoral y supervivencia

Como consecuencia de lo anteriormente comentado referente a la ploidía tumoral con respecto a parámetros de claro y reconocido significado pronóstico (estadio, diferenciación y volumen tumoral), parece lógico deducir que la supervivencia de los pacientes con carcinoma prostático, también se relaciona con la ploidía del ADN<sup>19,257,303</sup>.

En estudios de análisis de la supervivencia específica para el carcinoma prostático, se ha demostrado que la aneuploidía tiene significado pronóstico adverso. Tribukait<sup>432,433</sup> en sus trabajos de análisis de DNA de carcinomas prostáticos mediante CF, indica que la supervivencia de los pacientes a los 4 años es de 95% para tumores diploides, 80% para los tetraploides, 40% para los aneuploides no tetraploides y 25% para formas multiploides.

En correlación con otros parámetros, se ha observado que en el estadio D1 (presencia de metástasis linfáticas) la supervivencia media de los pacientes con carcinomas prostáticos es de 8.8 años para los tumores diploides, y de 5 años para los tumores aneuploides<sup>416</sup>. Con respecto al grado de diferenciación tumoral, se señala que en estudios de seguimiento de 3 años<sup>143</sup>, habían fallecido todos los pacientes con carcinomas de alto grado histológico y además aneuploides, mientras que sólo fallecieron el 6% de los casos diploides de bajo grado. Con todo, hay discrepancias con tales resultados<sup>465</sup>.

En nuestro trabajo, fue la supervivencia de los pacientes, el único dato que ofrecía relación estadísticamente significativa con la presencia de aneuploidía.

### 5.3.6.- Índice proliferativo tumoral y pronóstico

El índice proliferativo o tasa proliferativa de un tumor, expresa o nos da información sobre la cantidad o porcentaje de células tumorales que se encuentran en fase de síntesis (fase S) del ciclo celular <sup>303</sup>, por lo que se conoce también con los términos de "fracción de fase S" y "fracción celular en fase S" entre otros.

En ciertas localizaciones como la mama, es reconocido el valor pronóstico de la determinación del índice proliferativo del carcinoma mamario, en el sentido, de que el incremento de dicho parámetro, se asocia con mayor agresividad del tumor, incluso con rango o valor superior que el tipo de ploidía tumoral <sup>364</sup>.

En neoplasias prostáticas, se ha asociado el aumento de actividad de fosfatasa ácida con la fracción celular en fase S o S+G2M (fracción hiperdiploide), siendo dato distintivo entre tumores malignos y benignos <sup>384</sup>; sin embargo, el significado pronóstico de este análisis, no se investiga dentro de los procesos malignos <sup>19</sup>. Se argumenta que la fracción de células genuinamente neoplásicas de una muestra ordinaria varía entre el 10 y el 20%, por lo que existiría solapamiento entre células normales y neoplásicas, y consiguientemente se hace difícil el cálculo preciso de la fracción celular en fase S, particularmente en tumores diploides <sup>303</sup>.

Deitch y cols <sup>96</sup> en tumores epiteliales prostáticos, introducen el concepto de "diploidía anormal", como indicativo de progresión de la ploidía en estadios precoces del cáncer, y cuya detección radica en el fundamento técnico de que el tumor ofrece un histograma con perfil diploide, pero cuyo porcentaje de células con concentración de ADN por encima del de la población celular en reposo (G0-G1) es elevado (26.5 +/- 5.3), es lo que se designa como "porcentaje de células en hiperdiploidía" (PHD). A nuestro juicio, el PCD es una determinación más grosera y menos selectiva que la valoración de la "fracción hiperdiploide" (porcentaje de células en fase S+G2M), y por

supuesto, que la del cálculo de la fracción celular en fase S (índice proliferativo). Pero lo que resulta para nosotros relevante, es que en el estudio de Deitch y cols.<sup>36</sup>, la detección de cifras altas de PHD (presuntamente también del índice proliferativo) en tumores diploides parece relacionarse con mayor progresión del tumor, aunque el informe no es concluyente y sugiere búsqueda y correlación con otros parámetros, tales como alteraciones de tipo molecular.

Ante lo expuesto, encontramos poca información sobre el significado del índice de ADN en el carcinoma prostático. En nuestro estudio, los casos aneuploides (los 7 del total de 38 casos en los que se determinó el índice proliferativo) mostraron índices proliferativos (fracción o porcentaje de células en fase S) elevados (>15%); de igual forma, los tumores diploides pobremente diferenciados (puntuaciones de 9 y 10), presentaron índices proliferativos por encima del 10%. Todo ello, al parecer indicativo de que el índice proliferativo alto se relaciona con mayor agresividad del carcinoma prostático. En suma, que la presencia en neoplasias malignas de la próstata de diploidía y cifras bajas de fracción celular en fase S (índice proliferativo) son datos indicativos de menor progresión tumoral y mejor respuesta a la terapia hormonal<sup>39,316,477</sup>.

### 5. 3. 7.- Correlación de los resultados del análisis de ADN por citometría de flujo con los de otros procedimientos de estudio con significado pronóstico

Ya hemos comentado el significado pronóstico de los datos que nos proporciona el análisis del ADN mediante CF en el carcinoma prostático. En este apartado analizaremos las apreciaciones de otras técnicas de estudio de interés pronóstico en neoplasias malignas de la próstata, comparando sus resultados con los de la CF.

#### 5. 3. 7. 1.- Citometría de flujo (CF) versus citometría estática o de imagen (CI)

El contenido de ADN en carcinomas prostáticos se puede determinar tanto por CF como por CI, llegándose a grandes rasgos a resultados similares, en el sentido, de que aquellos tumores que ofrecen anormal contenido en ADN (aneuploides) comportan

peor pronóstico que los tumores diploides <sup>39,442</sup>. Se informa concordancia entre hallazgos de CI por aguja y CF en prostatectomías, con cifras que llegan a alcanzar un 82% <sup>458</sup>. No obstante, existen diferencias metodológicas en cuanto a la interpretación de los resultados entre ambas técnicas, lo que explica ciertas discrepancias <sup>39,194</sup>. Así, comparando los resultados de la CF y los de la CI aplicados al análisis de ADN en carcinomas prostáticos se encuentran ventajas de la CI respecto a la CF <sup>134,194,303,442</sup>.

1) Ante pequeñas muestras como biopsias de punción prostática, puede existir escasez de tumor, planteándose limitaciones a los estudios por CF, lo que no suele ocurrir con la CI <sup>39,194,442</sup>.

2) En casos con coeficientes de variación (CV) altos, mediante CF resulta difícil o imposible separar o desenmascarar poblaciones tumorales aneuploides cercanas a la diploidía o tetraploidía <sup>134,352,442</sup>.

3) La CF no permite simultanear el análisis de ADN con el citodiagnóstico o citomorfología.

4) La CF dentro de la rutina, no permite la valoración de células endocrinas, de posible interés pronóstico.

5) En CF no es posible reanalizar la muestra para revisión de cálculos citomorfométricos.

6) Los histogramas de CF no permiten seleccionar células normales de células tumorales diploides (en canal G0-G1) o tetraploides (en canal G2- M).

7) La citometría estática (CI) permite identificar poblaciones celulares normales que no detecta incluso la CF, por lo que la CI es útil para la apreciación de poblaciones celulares aneuploides raras <sup>39</sup>.

En contrapartida, la CI ofrece también desventajas con respecto a la CF en su aplicación para el análisis de ADN de carcinomas prostáticos:

1) El número de células examinadas en los estudios de CI oscila entre 100 y 500, lo que implica menor confianza estadística, a lo que se suma el componente subjetivo, aunque técnicas de evaluación computarizada pueden mejorar estos resultados<sup>134</sup>.

2) Quizás el mayor inconveniente de la CI, es que si bien permite discriminar más exactamente entre alto y bajo grado de malignidad histológica, también es cierto que la discriminación depende fuertemente del método de análisis de los histogramas<sup>145,442</sup>, que no sigue criterios uniformes, lo que dificulta la estandarización de los resultados y aplicación de protocolos adecuados<sup>39</sup>.

3) En parte como consecuencia de lo anterior, así como por la poca estandarización del método de preparación de las muestras, el número de casos analizados por CI suele ser insuficiente para determinar datos pronósticos con el mismo o mejor significado estadístico que con CF<sup>39</sup>.

4) No hay suficientes estudios de CI sobre supervivencia, que demuestren su utilidad para introducirlos en la rutina de un protocolo a efectos pronósticos. Tampoco está claramente demostrado, que la detección con más fiabilidad de poblaciones celulares aneuploides raras mediante CI, contribuya a mejorar sensiblemente el pronóstico con respecto a la CF.

Por todo lo anterior y por el momento, la CI no está reconocida como técnica de rutina que sustituya a la CF<sup>39,188</sup>. Sin embargo, es aconsejable la aplicación de CI en algunos casos, adquiriendo más valor, particularmente cuando se puede combinar con la CF.

Existen técnicas de doble marcaje en citometría de flujo que permiten valorar

simultáneamente la ploidía del ADN con otros parámetros citomorfométricos de posible valor pronóstico. De este modo, en el carcinoma prostático se han aplicado técnicas de CF que permiten el análisis conjunto del ADN y la "proteína nuclear"<sup>69</sup>, producto éste último, que aporta información para detectar tumores casi diploides o cerca de la diploidía, grupo de neoplasias prostáticas, que parece tener pronóstico intermedio entre tumores diploides y formas más desfavorables de tipo aneuploide<sup>352</sup>.

### 5.3.7.2.- Citometría de flujo (CF) versus otros métodos de estudio

Si bien como ya hemos descrito, son relativamente frecuentes los trabajos de correlación de análisis de ADN por CF y CI en el carcinoma prostático, existen otros trabajos que comparan la ploidía del ADN mediante CF con los resultados obtenidos por otras técnicas.

En el carcinoma de próstata adquieren especial vigencia por su actualidad, técnicas de genética molecular del tipo hibridación in situ fluorescente, generalmente designada como FISH, que permite detectar aberraciones estructurales y numéricas de los cromosomas<sup>93,261,412</sup>, siendo especialmente específica la prueba en el carcinoma prostático para los cromosomas 1,7, 10, e Y<sup>412</sup>. El FISH es un método de gran sensibilidad que permite detectar pequeñas variaciones del ADN y por tanto aneuploidías, que no son perceptibles mediante análisis de ADN por CF<sup>242,347,351,412</sup>. Mediante esta técnica, se evidencia alta tasa de aneuploidías (78%) con un promedio de 60%<sup>412</sup>; no obstante, si bien el FISH requiere menos tejido para estudio que la CF, el método es laborioso y más costoso<sup>420</sup>, y no está del todo claro, si las aberraciones cromosómicas se asocian necesariamente a comportamiento agresivo del carcinoma prostático, y por tanto, si tienen valor predictivo pronóstico<sup>412</sup>. Incluso en trabajos que relacionan métodos de análisis de ADN mediante CI, CF y FISH, se aprecian algunas discrepancias al comparar los 3 métodos de análisis<sup>347</sup>.

Por último, también se señala correlación de valores de fosfatasa ácida prostática (PAP) y antígeno prostático específico (PSA) en tejidos, con variaciones de la ploidía <sup>200,411</sup>. En otros trabajos se encuentra buena relación entre actividad 5- alfa reductasa (enzima metabólico androgénico) y parámetros de buen pronóstico provenientes del análisis de ADN por CF <sup>192</sup>.

#### 5.4- VALORACIÓN DE LA DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA p53 EN EL CARCINOMA PROSTÁTICO

Como ya es generalmente reconocido, el gen supresor tumoral p53 localizado en el cromosoma humano 17, codifica fosfoproteínas involucradas en la regulación del ciclo celular. La mutación de dicho gen es la más común de las neoplasias malignas del humano <sup>330</sup>. La proteína p53 anormal es elaborada por el gen mutado, y se acumula en la célula, donde puede ser detectada por técnicas inmunohistoquímicas <sup>58,330</sup>.

En lo referente al cáncer de próstata, Isaacs y cols en 1991 <sup>221</sup> fueron de los primeros en sugerir la importancia patogénica de la mutación del gen p53. También resulta de interés más recientemente, la detección de inmunorreactividad positiva para la p53 en el tejido prostático benigno peritumoral, concretamente en células basales de glándulas hiperplásicas, posiblemente todo ello exponente de un cambio precanceroso por mutación del gen p53 <sup>235</sup>.

Al margen de la importancia del gen mutado p53 en la patogenia del cáncer prostático, actualmente interesa establecer si su expresión inmunohistoquímica en forma de proteína anómala, tiene significado pronóstico <sup>235,393</sup>. Las cifras de detección de p53 por inmunohistoquímica en el carcinoma prostático oscilan entre el 12.7 y 21% <sup>57,235,393,402</sup>; en nuestro caso la cifra fue algo más elevada con un 28.5%, quizás porque nuestra casuística no fue suficientemente amplia (35 casos), aunque hay trabajos que reflejan mayor incidencia, hasta un 47% <sup>147</sup>, posiblemente por no emplear

criterios más exigentes o estrictos en cuanto a la valoración de la intensidad de expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 en células tumorales.

Frente a trabajos que señalan no encontrar significado estadístico entre la asociación de la positividad de p53 y el grado tumoral <sup>147,282,402</sup>, informes más recientes <sup>235,393</sup> indican asociación de la sobreexpresión inmunohistoquímica de la proteína anómala con un alto o mayor grado histológico o "score" de Gleason. En nuestro estudio la positividad de la p53 en bajas puntuaciones de carcinoma fue aproximadamente de un 12%, frente a un 44.5% en altos grados (7-10). Inequivocamente en nuestro trabajo la expresión de la proteína anormal se relacionó con grados nucleares altos (2 o 3), ya que ningún grado nuclear 1 mostró positividad para la p53. En cualquier caso trabajos recientes informan que la inmunoeexpresión de la p53 es un indicador pronóstico independiente, particularmente en la valoración entre grados bajos e intermedios de carcinoma prostático <sup>282</sup>.

Constituye una aportación en el presente estudio, el hallazgo de que la necrosis tumoral se relacionase con mayor incidencia en la expresión tumoral de la proteína p53 del carcinoma de próstata.

No encontramos relación entre ploidía tumoral y expresión inmunohistoquímica positiva para la p53, en contraposición con otros informes previos <sup>448</sup>. Sin embargo, apreciamos que índices proliferativos tumorales bajos (% de células en fase S < 10%) no se asociaron a expresión positiva de la p53, o lo que es lo mismo, que la inmunotinción positiva para la p53 en el carcinoma prostático es inversamente proporcional a una baja tasa de proliferación celular, como señalan otros <sup>448</sup>.

### ANÁLISIS MULTIVARIABLE

Al aplicar el método de regresión de Cox para analizar simultáneamente la importancia de los factores significativos en el análisis univariable, observamos que, en nuestro estudio, los factores más relevantes y por orden de mayor a menor valor pronóstico son el grado nuclear, el estadio, el hematocrito y la invasión capsular prostática.

## 6.- CONCLUSIONES

## 6.1.- CONCLUSIONES CLÍNICAS

- I) La edad del diagnóstico no fue un factor pronóstico significativo en nuestro estudio, al comparar la supervivencia cáncer-específica de los pacientes con edad más avanzada (mayores de 69.7 años) con aquellos más jóvenes ( menores de 69.7 años). Tampoco lo fue el estado civil de los pacientes.
- II) El pronóstico en pacientes con metástasis a distancia fue claramente desfavorable con una supervivencia media de 22.8 meses .
- III) La presencia de anemia importante, de elevación de la VSG y de las fosfatasas alcalinas fueron factores pronósticos adversos en pacientes con estadios avanzados. En este grupo de pacientes, los valores séricos elevados de fosfatasas alcalinas se asociaron sistemáticamente con la presencia de metástasis óseas.
- IV) La fosfatasa ácida prostática no fue factor pronóstico en nuestro estudio, no observándose correlación estadísticamente significativa entre sus valores séricos y la presencia de metástasis, estadios o supervivencia.
- V) Respecto a la causa de defunción, la mayoría de los pacientes fallecieron por cáncer de próstata (78.6%) siendo el tiempo de supervivencia en este grupo de pacientes menor que los que habían fallecido por otras causas.

## 6.2.- CONCLUSIONES PATOLÓGICAS

- I) En lo referente al estadio, la mayor parte de nuestra casuística se encontraba en estadio B. Por otra parte, estadios bajos (A) se asociaron a mayor supervivencia de los pacientes, mientras que estadios altos (C y D) se relacionaron

con muy alta tasa de mortalidad. Tales resultados fueron estadísticamente significativos.

II) La necrosis tumoral tanto de patrón comedocarcinomatoso como no comedocarcinomatoso se correlacionó con altos grados nucleares y elevado score de VACURG (parámetros de mal pronóstico). Estos resultados fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.001$ )

III) No encontramos correlación entre intensidad de respuesta inflamatoria del estroma tumoral ( estroma-reacción ) con grado nuclear y score de VACURG.

IV) En lo que se refiere a la ploidía tumoral determinada mediante citometría de flujo en el presente estudio:

1) La incidencia de aneuploidía fue relativamente baja con 19 casos (23.17% del total analizado).

2) En el estadio A la aneuploidía fue relativamente baja (12.5%), mientras que en el estadio D la aneuploidía fue más frecuente (38%).

3) La aneuploidía se presentó sistemáticamente en carcinomas moderada y pobremente diferenciados (índice sumatorio de VACURG mayor o igual a 6).

4) Todos los tumores con índice sumatorio (VACURG) igual o por debajo de 6 fueron diploides.

5) La puntuación de VACURG en tumores tetraploides fue relativamente baja ( todos con puntuación de 6).

6) Carcinomas prostáticos con grados nucleares altos (2,3) fueron relativamente más frecuentes en tumores aneuploides.

7) La cifra de pacientes fallecidos con tumores aneuploides fue relativamente mayor que con tumores diploides.

Muchos de los hallazgos anteriores son indicativos o sugestivos de que tumores aneuploides comportan peor pronóstico que los tumores diploides, aunque tales valores no ofrecieron significación estadística.

V) En lo referente al índice proliferativo (% células en fase S) de carcinomas prostáticos en el estudio:

1) Todos los tumores aneuploides tenían porcentaje alto de células en fase S (>15%).

2) Tumores diploides con porcentaje celular en fase S superior a 10, se asociaron con una alta gradación nuclear respecto a tumores diploides con % celular en fase S por debajo de 10.

3) En estadio B los tumores diploides con índices proliferativos bajos (<10%) coincidieron con grados nucleares bajos (1), mientras que índices proliferativos altos solían coincidir con gradaciones nucleares altas (2,3).

El análisis en conjunto indica que un mayor incremento del índice proliferativo determinado por citometría de flujo, se asocia a parámetros pronósticos adversos, aunque tales resultados no fueron estadísticamente significativos.

VI) La invasión tumoral perineural en carcinomas prostáticos de nuestro estudio fue relativamente más frecuente en tumores aneuploides que diploides, independientemente del tipo de biopsia: cilindro, RTU o prostatectomía.

VII) En lo referente a la invasión capsular prostática con respecto a la ploidía tumoral:

- Se apreció con relativa frecuencia en cilindros con tumores diploides (23.6%).

- Se presentó en el 100% de piezas con tumores aneuploides.

- En muestras de resección transuretral no se encontró diferencias de incidencia entre tumores aneuploides y diploides.

VIII) La sobreexpresión inmunohistoquímica de la proteína p53 en el carcinoma prostático fue relativamente alta en nuestro estudio con un 28.5% de casos. De su correlación con otros parámetros de significado pronóstico encontramos:

- 1) Relación con grado nuclear e histología, así como con la presencia de necrosis tumoral.

- 2) No se apreció relación entre la detección positiva de p53 y ploidía de ADN, aunque sí se evidenció asociación con índices proliferativos altos (porcentaje de células en fase S >10%)

## 7.-BIBLIOGRAFÍA

1. Abrahamsson P.A.: The risks outweigh the benefits of radical prostatectomy in localised prostate cancer : the argument for. *Eur Urol*, 29 (suppl 2):27-30, 1996.
2. Adolfsson J.: Deferred treatment of low grade stage T3 prostate cancer without distant metastases. *J Urol*,149:326, 1992.
3. Adolfsson J., Cartensen J. et al.: Deferred treatment in clinically localised prostatic carcinoma. *Br J Urol*, 69:183-187, 1992.
4. Adolfsson J., Rönstrom L. et al.: The prognostic value of modal deoxyribonucleic acid in low grade, low stage, untreated prostatic cancer. *J Urol*, 144:1404-9, 1990.
5. Adolfsson J., Steineck G., et al.:Recent results of management of palpable clinically localized prostate cancer. *Cancer*, 72:310, 1993.
6. Adolfsson J., Tribukait B.: Evaluation of tumor progression by repeated fine needle biopsies in prostate adenocarcinoma: modal deoxyribonucleic acid value and cytological differentiation. *J Urol*, 144:1408-1410, 1990.
7. Adolfsson J.,Tribukait B.: Modal DNA-values in prostate cancer patients with deferred therapy or endocrine therapy. *Acta Oncologica*, 30:209-10, 1991.
8. Aihara M., Lebovitz R.M. et al.: Prostate specific antigen and Gleason grade: and immunohistochemical study of prostate cancer. *J Urol*, 151:1558, 1994.
9. Alemán A., García A. et al.: Mortalidad por tumores malignos. En: Atlas de mortalidad por cáncer en la Comunidad Autónoma de Canarias (1982-1990). 1ª ed. S/C Tenerife: Dirección General de Salud Pública, 11-23, 1995
10. Algaba F.: Carcinoma de próstata. En: Atlas de tumores urogenitales. Ed. Fundación Puigvert. Barcelona: Ediciones Pulso S.A., 187-247,1991.
11. Algaba F.: Evaluación anatomopatológica de la extensión del cáncer de próstata (Simposio de cáncer de próstata y lesiones precursoras). *Rev Esp Patología*, 29: 165-169, 1988.
12. Algaba F., Moreno A. et al.: Uropatología tumoral. Correlación morfológica, molecular y clínica. Barcelona: Ediciones Pulso S.A., 213-290, 1996.
13. Allepuz C., Sanz J.I. et al.: La biopsia de vesículas seminales en el estadije del cáncer prostático. *Actas Urol Esp*, LVII Congreso AEU:158, 1992.
14. Andriole G.L., Kavoussi L.R. et al.: Transrectal ultra-sonography in the diagnosis and staging of carcinoma of the prostate. *J Urol*, 140: 758-760, 1988.

15. Anscher M.S., Prosnitz L.R.: Multivariate analysis of factors predicting local relapse after radical prostatectomy-possible indications for postoperative radiotherapy. *Int J Rad Oncol Biol Phys*, 21:941, 1991.
16. Aprikian A.G., Sarkis A.S et al.: Immunohistochemical determination of p53 protein nuclear accumulation in prostatic adenocarcinoma. *J Urol*, 151:1276-80, 1994.
17. Aus G., Hugosson J. et al.: Long-term survival and mortality in prostate cancer treated with noncurative intent. *J Urol*, 154: 460-465, 1995.
18. Ayala A.G., Ro J.Y., et al.: The prostatic capsule: Does it exist? Its importance in the staging and treatment of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 13: 21-27, 1989.
19. Ayala A.G., Ro J.Y. et al.: DNA flow cytometry of prostate adenocarcinoma. *Patologia*, 23:137-138, 1990.
20. Babaian R.J., Granow W.A.: Reliability of Gleason grading system in comparing prostate biopsies with total prostatectomy specimens. *Urology*, 25:564-567, 1985.
21. Bahnson R.R., Dresner S.M. et al.: Incidence and prognostic significance of lymphatic and vascular invasion in radical prostatectomy specimens. *Prostate*, 15:149-155, 1989.
22. Bain G.O., Koch M. et al.: Feasibility of grading prostatic carcinomas. *Arch Pathol Lab Med*, 106:265-267, 1982.
23. Baker S.J., Fearon E.R. et al: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, 244:217, 1989.
24. Baker S.J., Markowitz S. et al: Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*, 249:912, 1990.
25. Barlogie B., Drewinko B. et al: Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *Am J Med*, 69:195, 1980.
26. Barlogie B., Raber M.N. et al: Flow cytometry in Clinical Cancer Research. *Cancer Res* , 43:3982, 1983.
27. Bastacky S.S., Epstein J.I.: The sensitivity and specificity of perineural invasion on needle biopsy of prostate cancer in predicting capsular penetration at radical prostatectomy. *Mod Pathol*, 4: 43 A (Abstr.), 1991.

28. Bastacky S.I., Walsh P.C. et al.: Relationship between perineural tumor invasion on needle biopsy and radical prostatectomy capsular penetration in clinical stage B adenocarcinoma of the prostate. *Am J Surg Pathol*, 17 (4):336-341, 1993.
29. Bates R.J., Chapman C.M. et al.: Immunohistochemical identification of prostatic acid phosphatase: correlation of tumor grade with acid phosphatase distribution. *J Urol*, 127: 574-580, 1982.
30. Bauer W.C., McGavran M.H. et al.: Unsuspected carcinoma of the prostate in suprapubic prostatectomy specimens: a clinicopathologic study of 55 consecutive cases. *Cancer*, 13: 370-378, 1960.
31. Bazinet M., Cote R.J. et al.: Immunohistochemical characterization of two monoclonal antibodies, P 25.48 and P 25.91, which define a new prostate-specific antigen. *Cancer Res*, 48:6938-6942, 1988.
32. Bennett B.D., Culberson D.E. et al.: Histopathology of prostatitis. *J Urol*, 143: 265, 1990.
33. Bentvelsen F.M., Van de Ouden D. et al.: Prostate specific antigen in screening for recurrence following radical prostatectomy for localized prostatic cancer. *Brit J Urol*, 72:88, 1993.
34. Bentz M.S., Cohen C. et al.: Immunohistochemical acid phosphatase level an tumor grade in prostatic carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, 106: 476-480, 1982.
35. Berner A., Waere H. et al.: DNA ploidy, serum prostate specific antigen, histological grade and immunohistochemistry as predictive parameters of lymph node metastases in T1-T3/M0 prostatic adenocarcinoma. *Brit J Urol*, 75: 26-32, 1995.
36. Bernstein L.H., Rudolph R.A. et al.: Medically significant concentration of prostate-specific antigen in serum assessed. *Clin Chem*, 36:515-8, 1990.
37. Bertagna C., De Géry A. et al.: Efficacy of the combination of nilutamide plus orchidectomy in patients with metastatic prostatic cancer: a meta-analysis of seven randomized double-blind trials (1056 patients). *Brit J Urol*, 73:396, 1994.
38. Bethencourt B., Batista N., y cols.: Grado de infiltración linfofocitaria y necrosis tumoral como factores pronósticos en el cáncer colorectal. Comunicación: III Congreso nacional de oncología médica. Palma de Mallorca, 15-17 de Mayo, 1991.
39. Blanes A., Matilla A.: Utilidad de la ploidía del ADN en el cáncer de próstata. *Patología*, 29 (2): 183-85, 1996.

- 
40. Blom J.H.M., Ten Kate F.J.W. et al.: Morphometrically estimated variation in nuclear size: A useful tool in grading prostatic cancer. *Urol Res*, 18: 93-99, 1990.
41. Blumenfeld W., Tuca S. et al.: Incidental lymphocytic prostatitis. Selective involvement with nonmalignant glands. *Am J Surg Pathol*, 16(10): 975-981, 1992.
42. Blute M.L., Nativ O. et al.: Pattern of failure after radical retropubic prostatectomy for clinically and pathologically localized adenocarcinoma of the prostate: influence of tumor deoxyribonucleic acid ploidy. *J Urol*, 149:1262-1265, 1989.
43. Bocking A., Kiehn J. et al.: Combined histologic grading of prostatic carcinoma. *Cancer*, 50:288-294, 1982.
44. Bookstein R., Shew J.Y. et al.: Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene. *Science*, 247: 712-715, 1990.
45. Borre M., Nestrom B. et al.: The natural history of prostate carcinoma based on a danish population treated with no intent to cure. *Cancer*, 80: 917-928, 1997.
46. Bostwick D.G.: Neoplasms of the prostate. In: Bostwick D.G., Eble, J.E.-*Urologic Surgical Pathology*. St Louis: Ed. Mosby, 343-421, 1997.
47. Bostwick D.G.: The significance of tumor volume in prostate cancer. *Urol Ann*, 8:1-22, 1994.
48. Bostwick D.G., Eble J.N.: Variants of prostatic carcinoma. In: Bostwick D.G.-*Pathology of the Prostate*. New York: Churchill Livingstone, 95-98, 1990.
49. Bostwick D.G., Qian J. et al.: Prediction of capsular perforation and seminal vesicle invasion in prostate cancer. *J Urol*, 155:1361-1367, 1996.
50. Brailand R.C.: Flow cytometry. *Arch Pathol Lab Med*, 107:1, 1983.
51. Brawer M.K., Lange P.H.: Prostate-specific antigen in management of prostatic carcinoma. *Urology (suppl)*, 33:11, 1989.
52. Brawn P.N.: The dedifferentiation of prostatic carcinoma. *Cancer*, 52:246-251, 1983.
53. Brawn P.: Histologic features of metastatic prostate cancer. *Hum Pathol*, 23: 267-272, 1992.

- 
54. Brawn P.N., Ayala A.G. et al.: Histologic grading study of prostate adenocarcinoma: the development of a new system and comparison with other methods- a preliminary study. *Cancer*, 49:525-32, 1982.
55. Brawn P., Kulh D. et al.: Stage D1 prostate carcinoma: the histologic appearance of nodal metastases and its relationship to survival. *Cancer*, 65: 538-543, 1990.
56. Broders A.C.: Carcinoma grading and practical application. *Arch Pathol Lab Med*, 2:376-381,1926.
57. Brookstein R., Mc Grogan D. et al.: p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. *Cancer Res* 53: 3369-3373, 1993.
58. Brunner J.M., Connelly J.H. et al.: p53 protein immunostaining in routinely processed paraffin-embedded sections. *Mod Pathol*, 6: 189-194, 1993.
59. Büchner T., Hiddemann W. et al: Differential patterns of DNA aneuploidy in human malignancies. *Pathol Res Pract*, 179: 310, 1985.
60. Burnett A.L., Chan D.W. et al.: The value of serum enzymatic acid phosphatase in the staging of localized prostate cancer. *J Urol*, 148:1831-4, 1992.
61. Byar D.P., Mostofi F.K. et al.: Carcinoma of the prostate: prognostic evaluation of certain pathologic features in 208 radical prostatectomies examined by the step-section technique. *Cancer*, 30:5-13, 1972.
62. Carlton J.C., Zagars G.K. et al.: The role of serum prostatic acid phosphatase in the management of adenocarcinoma of the prostate with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 19: 1383-8, 1990.
63. Carter B.S.: Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol*, 150:797-802,1993.
64. Catalona W.J. : Management of cancer of the prostate. *New Engl J Med*, 331:996, 1994.
65. Catalona W.J., Fleischmann J. et al.: Pelvic lymph node status as predictor of extracapsular tumor extension in clinical stage B prostatic cancer. *J Urol*, 129:327, 1982.
66. Catalona W.J., Smith D.S.: 5-year tumor recurrence rates after anatomical radical retropubic prostatectomy for prostate cancer. *J Urol*, 152:1837, 1994.

67. Catalona W.J., Stein A.J. et al.: Grading errors in prostatic needle biopsies: Relation to the accuracy of tumor grade in predicting pelvic lymph node metastases. *J Urol*, 127:919-922, 1982.
68. Cavenee W.K., Dryja T.P. et al: Expression of recessive alleles by chromosomal mechanism in retinoblastoma. *Nature*, 305:779, 1983.
69. Ciancio G., Pollack A. et al.: Flow cytometric analysis of DNA and nuclear protein in paraffin-embedded tissue. *Cytometry*, 14:205-9, 1993.
70. Cintra M.L., Billis A.: Histological grading of prostatic adenocarcinoma: intraobserver reproducibility of the Mostofi, Gleason and Böcking grading systems. *Int Urol Nephrol*, 23:449- 454, 1991.
71. Cohen R.J., Gleason G. et al.: Neuroendocrine cells: a new prognostic parameter in prostate cancer. *Br J Urol*, 68:258-262, 1991.
72. Cohen R.J., Gleason G. et al.: Prostatic carcinoma: histological and immunohistological factors affecting prognosis. *Br J Urol*, 66:405-410, 1990.
73. Coon J.S., Landay A.L. et al: Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. *Lab Invest*, 57:453, 1987.
74. Coon J.S., Landay A.L. et al: Flow cytometric analysis of paraffin-embededd tumors: Implications for diagnostic pathology. *Hum Pathol*, 17:435, 1986.
75. Cooner W.H., Mosley B.R. et al.: Clinical application of transrectal ultrasonography and prostatic specific antigen in the search for prostate cancer. *J Urol*, 139: 758-61, 1988.
76. Corriere J.N., Cornog J.L. et al.: Prognosis in patients with carcinoma of the prostate. *Cancer*, 25:911-918, 1970.
77. Crawford E.D., Eisenberger M.A. et al.: A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma. *New Engl Med*, 321- 419, 1989.
78. Crissman J.D., Sakr W.A. et al.: DNA quantitation of intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the prostate. *Prostate*, 22:155-162, 1993.
79. Charbit A., Malaise E. et al.: Relation between the pathological nature and the grow rate of human tumors. *Europ J Cancer*, 7: 307, 1971.
80. Cheng W.S., Frydenberg M. et al.: Radical prostatectomy for pathologic stage C prostate cancer: influence of pathologic variables and adjuvant treatment on disease outcome. *Urology*, 42:283, 1993.

- 
81. Chodak G.W.: Screening for prostate cancer:role of ultrasonography. *Urol Clin North Am*, 16:657-61, 1989.
82. Chodak G.W.: Treatment of early prostatic cancer. *Acta Oncol*, 30:243, 1991.
83. Chodak G.W., Thisted R.A. et al.: Results of conservative management of clinically localized prostate cancer. *N Eng J Med*, 330:242-248, 1994.
84. Chodak G.W., Vogelzang N.J. et al.: Independent prognostic factors in patients with metastatic (stage D2) prostate cancer. The Zoladex Study Group. *JAMA*, 265:618, 1991.
85. Christensen W.N., Partin A.W. et al.: Pathologic findings in clinical stage A2 prostate cancer. Relation of tumor volume, grade, and location to pathologic stage. *Cancer*, 65:1021-1027, 1990.
86. Christenson B., Tribukait B. et al: Cell proliferation and DNA content in non-Hodgkin's lymphoma. Flow cytometry in relation to lymphoma classification. *Cancer*, 58: 1295, 1986.
87. Chybowski F.M., Larsen- Keller J.J. et al.: Predicting radionuclide bone scan findings in patients with newly diagnosed, untreated prostate cancer: prostate specific antigen is superior to all other clinical parameters. *J Urol*, 145:313-318, 1991.
88. D'Amico A.V., Whittington R. et al.: A multivariable analysis of clinical factors predicting for pathological features associated with local failure after radical prostatectomy for prostate cancer. *Int J Rad Oncol Biol Phys*, 30:293, 1994.
89. Danesi D.T., Spano M. et al.: Quality control study of Italian group of cytometry on flow cytometry cellular DNA content measurements. *Cytometry*, 14 : 576-83, 1993.
90. Danielsen H.E., Farrants G. et al.: Characterization of chromatin structure by image analysis- a method for the assessment of changes in chromatin organization. *Scan Microsc*, suppl., 3:297, 1989.
91. Dayal H.H., Polissar L. et al.: Race, socioeconomic status, and other prognostic factors for survival from prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 74:1001, 1985.
92. Debre B., Gevand N. et al.: Epidemiology of prostatic cancer. *J Int Med Res*, 18:3-7,1990.
93. Debruyne F.M.J.: Cytogenetic of prostate cancer. *Scand Urol Nephrol (Suppl)*, 162:65-71, 1994.

- 
94. De las Morenas A., Siroky M.B. et al.: Prostatic adenocarcinoma: Reproducibility and correlation with clinical stages of four grading systems. *Hum Pathol*, 19:595-597, 1988.
95. Deitch A.D., De Vere White R.W.: Flow cytometry as a predictive modality in prostate cancer. *Hum Pathol*, 23:352-9, 1992.
96. Deitch A.D., Miller G.J. et al.: Significance of abnormal diploid DNA histograms in localized prostate cancer and adjacent benign prostatic tissue. *Cancer*, 72:1892, 1993.
97. Dejter S.W., Cunningham R.E. et al.: Prognostic significance of DNA ploidy in carcinoma of the prostate. *Urology*, 33:361-366, 1989.
98. De Vere White R.W., Deitch A.D. et al.: Prognosis in disseminated prostate cancer as related to tumor ploidy and differentiation. *World J Urol*, 8:47-50, 1990.
99. Denis L.J., Carniero de Moura J.L. et al.: Goserelin acetate and flutamide versus bilateral orchiectomy: a phase III EORTC trial (38853). *Urology*, 42:119, 1993.
100. Der Simonian R., Clemens J. et al.: Vasectomy and prostate cancer risk. *Journal Clin Epidemiol*, 46:163-72, 1993.
101. Deschenes J., Weidner N.: Nuclear organizer regions (NORs) in hyperplastic and neoplastic prostate disease. *Am J Surg Pathol*, 14:1148-1155, 1990.
102. Devilee P., Von de Broek M. et al.: At least four different chromosomal regions are involved in loss of heterozygosity in human breast carcinoma. *Genomics*, 5:554, 1989.
103. De Voogt H.J., Suci S. et al.: Multivariate analysis of prognostic factors in patients with advanced prostatic cancer: results from 2 European Organization for Research on Treatment of Cancer Trials. *J Urol*, 141:883, 1989.
104. Diamond D.A., Berry S.J. et al.: A new method to assess metastatic potential of human prostate cancer: relative nuclear roundness. *J Urol*, 128:729-734, 1982.
105. Di Sant' Agnese P.A.: Neuroendocrine differentiation in human prostatic carcinoma. *Hum Pathol*, 23:287-296, 1992.
106. Draetta G.: Cyclins and cancer. *Trends Biochem*, 15: 378-383, 1990
107. Dressler L.G., Barton S.: DNA flow cytometry in solid tumors: practical aspects and clinical applications. *Sem Diagnost Pathol*, 6:55, 1989.

108. Dressler L.G., Seamer L.C. et al.: DNA flow cytometry and prognostic factor in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer*, 61 (3) :420-27,1988.
109. Dube V.E., Farrow G.M. et al.: Prostatic adenocarcinoma of ductal origin. *Cancer*, 32: 402-409, 1973.
110. Eble J.N., Angermeier P.A.: The role of fine needle aspiration and needle core biopsies in the diagnosis of primary prostatic carcinoma. *Hum Pathol*, 23:249-57, 1992.
111. Effert P.J., Neubauer A. et al.: Alterations of the p53 gene are associated with the progression of a human prostate carcinoma. *J Urol*, 147:789-793, 1992.
112. Eisenberger M.A., Crawford E.D. et al.: Prognostic factors in stage D2 prostate cancer: important implications for future trials: results of a cooperative intergroup study (INT: 0036). *Sem Oncol*, 21:613, 1994.
113. Eisenberger M.A., Nelson W.G.: How much can we rely upon the level of PSA or endpoint for evolution of clinical trials? A word of caution. *J Natl Cancer Inst*, 88:779, 1996.
114. Elder J.S., Jewett H.J. et al.: Radical perineal prostatectomy for clinical stage B2 carcinoma of the prostate. *J Urol*, 127: 704-706, 1982.
115. Ennis R.D., Flynn S.D. et al.: Preoperative serum prostate-specific antigen and Gleason grade as predictors of pathologic stage in clinically organ confined prostate cancer: implications for the choice of primary treatment. *Int J Rad Oncol Biol Phys*, 30:317, 1994.
116. Epstein J.I.: Differential diagnosis in pathology urologic disorders. Igaku-Shoin. New York-Tokio, 108-109, 1992.
117. Epstein J.I.: Evaluation of radical prostatectomy capsular margins of resection. *Am J Surg Pathol*, 14:626, 1990.
118. Epstein J.I.: The evaluation of radical prostatectomy specimens: Therapeutic and prognostic implications. *Pathol Annu*, 26:159-210, 1991.
119. Epstein, J.I., Berry S.J. et al.: Nuclear roundness factor: a predictor of progression in untreated Stage A2 prostate cancer. *Cancer*, 54:1666-1671, 1984.
120. Epstein J.I., Carmichael M. et al.: Is tumor volume an independent predictor of progression following radical prostatectomy? A multivariate analysis of 185 clinical

stage B adenocarcinomas of the prostate with 5 years of followup. *J Urol*, 149:1478, 1993.

121. Epstein, J.I., Carmichael M.J.et al.: Influence of capsular penetration on progression following radical prostatectomy: a study of 196 cases with long-term followup. *J Urol*, 150:135, 1993.

122. Epstein J.I., Carmichael M. et al.: Adenocarcinoma of the prostate invading the seminal vesicle: definition and relation of tumor volume grade and margins of resection to prognosis. *J Urol*, 149:1040, 1993.

123. Epstein J.I., Eggleston J.C. et al: Prognosis of untreated stage A1 prostatic carcinoma: A study of 94 cases with extended follow-up. *J Urol*, 136:837, 1986.

124. Epstein J.I., Eggleston J.C.: Immunohistochemical localization of prostate-specific acid phosphatase and prostate-specific antigen in stage A2 adenocarcinoma of the prostate:prognosis implications. *Hum Pathol*, 15:853-859, 1984.

125. Epstein J.I., Lieberman P.H.: Mucinous adenocarcinoma of the prostate gland. *Am J Surg Pathol*, 9:299-308, 1985.

126. Epstein J.I., Oesterling J.E.et al.: The volume and anatomical location of residual tumor in radical prostatectomy specimens removed for stage A1 prostate cancer. *J Urol*, 139:975-979, 1988.

127. Epstein J.I., Pizov G. et al.: Correlation of prostate cancer nuclear desoxyribonucleic acid, size, shape and Gleason grade with pathological stage at radical prostatectomy. *J Urol*, 148:87-91, 1992.

128. Epstein J.I., Pizov G. et al.: Correlation of pathologic findings with progression after radical retropubic prostatectomy. *Cancer*, 71:3582-3593, 1993.

129. Epstein J.I., Steinberg G.D.: The significance of low-grade prostate cancer on needle biopsy: A radical prostatectomy study of tumor grade, volume, and stage of the biopsied and multifocal tumor. *Cancer*, 66:1927-1932, 1990.

130. Eriksson A., Carlström K.: Prognostic value of serum hormone concentrations in prostatic cancer. *Prostate*, 13:249, 1988.

131. Ernst D.S., Hanson J.et al.: Analysis of prognostic factors in men with metastatic prostate cancer. *J Urol*, 146:372, 1991.

132. Eskelinen M., Lipponen P. et al.: Prognostic factors in prostatic adenocarcinoma assessed by means of quantitative histology. *Eur Urol*, 19:274-278, 1991.

133. Esposti P.L.: Cytologic malignancy grading of prostatic carcinoma by transrectal aspiration biopsy: A five-year follow-up of 469 hormone-treated patients. *Scand J Urol Nephrol*, 5: 199-209, 1971.
134. Falkmer U.G.: Methodologic sources of errors in image and flow cytometry DNA assessments of the malignancy potential of prostatic carcinoma. *Hum Pathol*, 23:360-7, 1992.
135. Falkmer U.G., Hagmar T. et al.: Efficacy of combined image and flow cytometric DNA assessments in human breast cancers: a methodological study based on routine histopathologic material of 2.024 excised tumor specimens. *Anal Cell Pathol*, 2:297-312, 1990.
136. Fearon E.R., Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759, 1990.
137. Ferro M.A., Barnes I. et al.: Tumour markers in prostatic carcinoma: a comparison of prostate-specific antigen with acid phosphatase. *Br J Urol*, 60:69-73, 1987.
138. Fincker F., Sauvan R. et al.: Systematic association of PAP and PSA determinations to bone scintigraphy in prostate cancer. *Am J Clin Oncol*, 11(suppl 2): 568-570, 1988.
139. Finlay C., Hinds P. et al.: The p53 protooncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, 57:1083, 1989.
140. Fisher E.R., Palekar A.S. et al.: Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant breast project ( protocol nº 4 ) IV. Significance of tumor necrosis. *Hum Pathol*, 9:523, 1978.
141. Fleming W.H., Hamel A. et al.: Expression of the c-myc protooncogene in human prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Cancer Res*, 46:1535-1538, 1986.
142. Fluchter S.H., Nelde H.J. et al.: Effect of treatment on the expression of estramustine-binding protein (EMBP) in prostatic cancer patients: An immunohistochemical study. *Prostate*, 14:27-43, 1989.
143. Fordham M.V.P., Burdge A.H. et al.: Prostatic carcinoma cell DNA content measured by flow cytometry and its relation to clinical outcome. *Br J Surg*, 73:400-403, 1986.
144. Forsslund G., Esposti P.L. et al.: The prognostic significance of nuclear DNA content in prostatic carcinoma. *Cancer*, 69:1432-1439, 1992.

- 
145. Forsslund G., Zetterberg A.: Ploidy level determinations in high-grade and low-grade malignant variants of prostatic carcinoma. *Cancer Res.*, 50:4281, 1990.
146. Foster C.S.: Predictive factors in prostatic hyperplasia and neoplasia. *Hum Pathol*, 21:575-577, 1990.
147. Foster C.S., Abel P.D.: Clinical and molecular techniques for diagnosis and monitoring of prostatic cancer. *Hum Pathol*, 23:395-401, 1992.
148. Foster C.S., McLoughlin J. et al.: Markers of the metastatic phenotype in prostate cancer. *Hum Pathol*, 23:381-394, 1992.
149. Foster C.S., Mostofi F.K.: Prostate cancer : Quo vadis?. *Hum Pathol*, 23: 209-210; 402-406, 1992.
150. Foster L.S., Jajodia P. et al.: The value of prostate specific antigen and transrectal ultrasound guided biopsy in detecting prostatic fossa recurrences following radical prostatectomy. *J Urol*, 149:1024, 1993.
151. Fowler J.E., Brooks J. et al.: Variable histology of anastomotic biopsies with detectable prostate specific antigen after radical prostatectomy. *J Urol*, 153:1011, 1995.
152. Fowler J.E., Mills S.E.: Operable prostatic carcinoma: Correlations among clinical stage, pathological stage, Gleason histological score and early disease-free survival. *J Urol*, 133: 49-52, 1985.
153. Franks L.M.: Latent carcinoma of the prostate. *J Pathol Bacteriol*, 68 : 603, 1954.
154. Frankfurt O.S., Chin J.L. et al.: Relationship between DNA ploidy, glandular differentiation and tumor spread in human prostate cancer. *Cancer Res*, 45:1418-1423, 1985.
155. Frankfurt O.S., Greco W.R. et al: Proliferative characteristics of primary and metastatic human solid tumors by DNA flow cytometry. *Cytometry*, 5:629, 1984.
156. Frazier H.A., Robertson J.E. et al.: Is prostate specific antigen of clinical importance in evaluating outcome after radical prostatectomy?. *J Urol*, 149:516, 1993.
157. Freitas J.E., Gilvydas R. et al.: The clinical utility of prostate-specific antigen and bone scintigraphy in prostate cancer follow up. *J Nucl Med*, 32:1387-1390, 1991.

158. Friedlander M.L., Hedley D.W. et al : Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumours. *J Clin Pathol*, 37:961, 1984.
159. Friedman J.E., Hiatt R.A. et al.: Case-control study of screening for prostatic cancer by digital rectal examinations. *Lancet*, 337:1526, 1991.
160. Fujikawa K., Sasaki M. et al.: Prognostic criteria in patients with prostate cancer: correlation with volume weighted mean nuclear volume. *J Urol*, 154, 2123-2127, 1995.
161. Furusato M., Mostofi FK.: Intraprostatic lymphatics in man : light and ultrastructural observations. *Prostate*, 1:15-23, 1980.
162. Gaeta J.I., Asirwatham J.F.et al.: Histologic grading of primary prostatic cancer: a new approach to an old problem. *J Urol*, 123:689-693, 1980.
163. Gallee M.P., Ten Kate F.J.et al.: Histological grading of prostatic carcinoma in prostatectomy specimens. Comparison of prognostic accuracy of five grading systems. *Br J Urol*, 65:368-375, 1990.
164. Gannon J.V., Lane D.P.: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasm. *Nature*, 349:802, 1991.
165. Gansler T., Catten J. et al.: Flow cytometric DNA analysis of neuroblastoma. Correlation with histologic and clinical outcome. *Cancer*, 58:2453-8, 1986.
166. Garcia A., Antona J.F. et al.: Geochemical prespection of cadmium in a high incidence aveal of prostate cancer. *Science*,116:243-51,1992.
167. Garnett J.E., Oyasu R. et al.: The accuracy of diagnostic biopsy specimens in predicting tumor grades by Gleason's clasification of radical prostatectomy specimens. *J Urol*, 131:690-693, 1984.
168. Garrigues J., Anderson J. et al.: Anti-tumor antibody BR96 blocks cell migration and binds to a lysosomal membrane glycoprotein on cell surface microspikes and ruffled membranes. *J Cell Biol*, 125:129, 1994.
169. Gansler T.: Applications of flow cytometric DNA quantitation in tumor pathology. *J Clin Immunoassay*, 12:30, 1989.
170. Gaylis F.D., Keer H.N. et al: Plasminogen activators in human prostate cancer cell lines and tumors: correlation with the aggressive phenotype. *J Urol*, 142:193-198, 1989.

171. George N.J.: Natural history of localised prostate cancer managed by conservative therapy alone. *Lancet*, 1:494, 1988.
172. Gervasi L. A., Mata J. et al.: Prognostic significance of lymph nodal metastases in prostate cancer. *J Urol*, 142: 332-6, 1989.
173. Ghazizadeh M., Sasaki Y. et al.: Silver staining of nucleolar organizer regions in prostatic lesions. *Histopathology*, 19:369-372, 1991.
174. Gillen P., Grace P.A. et al.: Predictive value of nucleolar organizer regions in prostatic carcinoma. *Br J Surg*, 75:1263 (Abstr), 1988.
175. Gimeno F., Piñango L. et al.: *Cáncer de Próstata-Diagnóstico precoz*. Madrid: Schering-Plough S.A., 11-69, 1994.
176. Ginsberg D., Michalovitz D. et al: Induction of growth arrest by a temperature-sensitive p53 mutant is correlated with increased nuclear localization. *Molec Cell Biol*, 1991.
177. Giovannucci E., Aschevio A.: A prospective cohort study of vasectomy and prostate cancer in US men. *JAMA*, 269:873-877, 1993.
178. Gleason D.F.: Gleason grading system. In: Bostwick, D.G.- *Pathology of the Prostate*. New York: Churchill Livingstone, 83-93, 1990.
179. Gleason D.F.: Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep*, 50:125-128, 1966.
180. Gleason D.F.: Histologic grading and clinical staging of carcinoma of the prostate. In: Tannenbaum M.- *Urologic Pathology: The Prostate*. Philadelphia: Lea and Febiger, 171-198, 1977.
181. Gleason D.F.: Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol*, 23:273-279, 1992.
182. Gleason D.F., Mellinger G.T.: The VACURG. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma combining histological grading and clinical staging. *J Urol*, 111:58-64, 1974.
183. Goerttler K., Stöhr M.: Automated cytology. *Arch Pathol Lab Med*, 106:657, 1982.
184. Graham S.D., Napalkov P. et al.: Microvascular invasion of the seminal vesicles in adenocarcinoma of the prostate. *Prostate*, 28:359-363, 1996.

185. Greene D.R., Egawa S. et al.: The distribution of residual cancer in radical prostatectomy specimens in stage A prostate cancer. *J Urol*, 145: 324-329, 1991.
186. Greene D.R., Taylor S.R. et al.: DNA ploidy by image analysis of individual foci of prostate cancer. Preliminary report. *Cancer Res*, 51:4084-4089, 1991.
187. Greene D.R., Wheeler T.M. et al.: Relationship between clinical stage and histological stage and histological zone of origin in early prostate cancer: morphometric analysis. *Br J Urol*, 68:499-509, 1991.
188. Grignon D.J., Hammond E.H.: College of american pathologist conference XXVI of clinical relevance of prognostic markers in solid tumors. Report of the prostate cancer working group. *Arch Pathol Lab Med*, 119:1122-1126, 1995.
189. Grossman H.B., Batata M. et al.:<sup>125</sup>I implantation for carcinoma of prostate. *Urology*, 20:591-598, 1982.
190. Guinan P., Bush I. et al.: The accuracy of the rectal examination in the diagnostic of prostate carcinoma. *N Eng J Med*, 303:499-503, 1980.
191. Gumerlock P.H., Poonamallee U.R. et al.: Activated ras alleles in human carcinoma of the prostate are rare. *Cancer Res*, 51: 1632-1637, 1991.
192. Habib F.K., Bissas A. et al.: Flow cytometric analysis of cellular DNA in human prostate cancer: Relationship to 5 alpha-reductase activity of the tissue. *Urol Res*, 17:239-243, 1989.
193. Häggman M., Norberg M. et al.: Characterization of localized prostatic cancer: Distribution, grading and pT-staging in radical prostatectomy specimens. *Scand J Urol Nephrol*, 27:7-13, 1993.
194. Häggman M., de la Torre M. et al.: Pre-and postoperative DNA ploidy patterns correlated to pt-stage, histological grade and tumour volume in total prostatectomy specimens. *Scand J Urol Nephrol*, 28:59-66, 1994.
195. Hakamori S.: Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res*, 52:257, 1989.
196. Hall P.A., Levison D.A.: Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol*, 43: 184-92, 1990
197. Hammond M.E., Sause W.T. et al.: Correlation of prostate-specific acid phosphatase and prostate-specific antigen immunocytochemistry with survival in prostate carcinoma. *Cancer*, 63:461-466, 1989.

198. Harada M., Mostofi, F.K. et al.: Preliminary studies of histologic prognosis in cancer of the prostate. *Cancer Treat Rep*, 61:223-225, 1977.
199. Harper M.E., Perrepoint C.G. et al.: Carcinoma of the prostate: relationship of pretreatment hormone levels to survival. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 20:477, 1984.
200. Hasenson M., Lundh B. et al.: PAP and PSA in prostatic carcinoma cell lines and aspiration biopsies: relation to hormone sensitivity and to cytological grading. *Prostate*, 14:83, 1989.
201. Haugen Q.A., Mjølnerod Q.: DNA ploidy as a prognostic factor in prostatic carcinoma. *Inter J Cancer*, 45:224-225, 1991.
202. Heaney J.A., Chang H.C. et al.: Prognosis of clinically undiagnosed prostatic carcinoma and the influence of endocrine therapy. *J Urol*, 118:283-287, 1977.
203. Hedley D.W.: Flow cytometry using paraffin-embededd tissue. *Cytometry*, 10:229, 1989.
204. Hedley D.W., Rugg C.A. et al: Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res*, 47:4729, 1987.
205. Helpap B.: Future directions in research of prostate carcinoma: *Path Res Pract*, 189:497-509, 1993.
206. Helpap B.: Review of the morphology of prostatic carcinoma with special emphasis on subgrading and prognosis. *J Urol Pathol*, 1:3-19, 1993.
207. Hering F., Huber P. et al.: Are the markers PSA and PAP of any predictive value in planning radical prostatectomy? In: *Abstracts of 6th Congress of European Society for Urological Oncology and Endocrinology*, Innsbruck, p. 55, May 2- 4, 1988.
208. Hering F., Rist M. et al.: Does microinvasion of the capsule and/or micrometastases in regional lymph nodes influence disease-free survival after radical prostatectomy?. *Br J Urol*, 66:177-181, 1990.
209. Hering F., Schmid H.P. et al.: Influence of microinvasion of the capsule and/or micrometastasis of regional lymph nodes on disease free survival after radical prostatectomy. *Ann Urol*, 28 (4) : 196-201, 1994.
210. Hetherington J.W., Siddal J.K. et al.: Contribution of bone scintigraphy, prostate acid phosphatase and prostatic-specific antigen to the monitoring of prostate cancer. *Eur Urol*, 14:1-5, 1988.

211. Hickey D., Todd B. et al.: Pre-treatment testosterone levels: significance in androgen deprivation therapy. *J Urol*, 136:138, 1986.
212. Hinds P., Finlay C. et al.: Mutation is required to activate the gene p53 for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol*, 63:739, 1989.
213. Holzel D.: Epidemiology of prostatic carcinoma from the Work Group Urology in the Munich Tumor Register. *Fortschr Med*, 190:521-5, 1991.
214. Hudson M.A., Bahnson R.R. et al.: Clinical use of prostate specific antigen in patients with prostatic cancer. *J Urol*, 142:1011-7, 1989.
215. Hugosson J., Aus G. et al.: Prostate cancer mortality in patients surviving more than 10 years after diagnosis. *J Urol*, 154:2115-2117, 1995.
216. Humphrey P.A., Frazier H.A. et al.: Stratification of pathologic features in radical prostatectomy specimens that are predictive of elevated initial postoperative serum prostate specific antigen levels. *Cancer*, 71:1821-1827, 1993.
217. Humphrey P.A., Vollmer R.T.: Intraglandular tumor extent and prognosis in prostatic carcinoma: Application of a grid method to prostatectomy specimens. *Hum Pathol*, 21:799-804, 1990.
218. Humphrey P.A., Walther P.J.: Adenocarcinoma of the prostate: tissue prognosticators (part II). *Am J Clin Pathol*, 100:256-69, 1993.
219. Humphrey P.A., Walther P.J. et al.: Histologic grade, DNA ploidy, and intraglandular extent as indicators of tumor progression of clinical stage B prostatic carcinoma: a direct comparison. *Am J Surg Pathol*, 15:1165-1170, 1991.
220. Ibrahim G.K., McDonald J.A. et al.: Differential immunoreactivity of Her-2/neu oncoprotein in benign, dysplastic and malignant prostatic tissues. *Surg Oncol*, 1:151-155, 1992.
221. Isaacs W.B., Carter B.S. et al.: Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles. *Cancer Res*, 51:4716-4720, 1991.
222. Ishikawa S., Soloway M.S., et al.: Prognostic factors in survival free of progression after androgen deprivation therapy for treatment of prostate cancer. *J Urol*, 141:1139, 1989.
223. Ito H., Yamaguchi K. et al.: Histochemical study of R 1881-binding protein, prostatic acid phosphatase, prostate-specific antigen, and r-seminoprotein in prostatic cancer. *Eur Urol*, 12: 49-53, 1986.

224. Iwakiri J., Grandbois K. et al.: An analysis of urinary prostate specific antigen before and after radical prostatectomy: evidence for secretion of prostate specific antigen by the periurethral glands. *J Urol*, 149:783, 1993.
225. James C.D., Carlborn E. et al.: Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:2858, 1989.
226. Jewett H.J., Eggleston J.C. et al.: Radical prostatectomy in the management of carcinoma of the prostate: probable causes of some therapeutic failures. *J Urol*, 107:1034-1040, 1972
227. Johansson J.E., Andersson S.O.: Deferred treatment in localized prostatic cancer. *Acta Oncol*, 30:221, 1991.
228. Johansson J.E., Adami H.O. et al.: High 10-year survival rate in patients with early, untreated prostatic cancer. *JAMA*, 267:2191, 1992.
229. Jones E.C.: Resection margin status in radical retropubic prostatectomy specimens: relationship to type of operation, tumor size, tumor grade and local tumor extension. *J Urol*, 144:89-93, 1990.
230. Jones E.C., McNeal J. et al.: DNA content in prostatic adenocarcinoma: a flow cytometry study of the predictive value of aneuploidy for tumor volume percentage Gleason grade 4 and 5, and lymph node metastases. *Cancer*, 66:752-7, 1990.
231. Jorgensen T., Berner A. et al.: Up-regulation of the oligosaccharide sialyl Lewis<sup>x</sup>: a new prognostic parameter in metastatic prostate cancer. *Cancer Res*, 55:1817, 1995.
232. Jorgensen T., Kanagasingham Y. et al.: Prognostic factors in patients with metastatic (stage D2) prostate cancer: experience from the scandinavian prostatic cancer group study -2. *J Urol*, 158: 164-170, 1997.
233. Jorgensen T., Müller C. et al.: Extent of disease based on initial bone scan: important prognostic predictor for patients with metastatic prostatic cancer: experience from the Scandinavian Prostatic Cancer Group Study No. 2 (SPCG-2). *Eur Urol*, 28:40, 1995.
234. Jorgensen T., Yogesan K. et al.: Histopathological grading and DNA ploidy as prognostic markers in metastatic prostatic cancer. *Brit J Cancer*, 71:1055, 1995.
235. Kallakury B.V.S., Figge J. et al.: Association of p53 immunoreactivity with high Gleason tumor grade in prostatic adenocarcinoma. *Hum Pathol*, 25:92-97, 1994.

236. Kelemen P.R., Buchman R.J. et al.: Nucleolar prominence as a diagnostic variable in prostatic carcinoma. *Cáncer*, 65:1017-1020, 1990.
237. Kelly W.K., Scher H.I. et al.: Prostate-specific antigen as a measure of disease outcome in metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Clin Oncol*, 11:607, 1993.
238. Killian C.S., Yang N. et al.: Prognostic importance of prostate specific antigen for monitoring patients with stages B2 to D1 prostate cancer. *Cancer Res*, 45:886, 1985.
239. Kleer E., Larson-Keller J.J. et al.: Ability of preoperative serum prostate-specific antigen value to predict pathologic stage and DNA ploidy. Influence of clinical stage and tumor grade. *Urology*, 41:207, 1993.
240. Kohen P.W., Drach G.W.: Patterns of inflammation in prostatic hyperplasia: a histologic and bacteriologic study. *J Urol*, 121:755-760, 1979.
241. Koss L.G.: The puzzle of prostatic carcinoma. *Mayo Clin Proc*, 5:193-197, 1988.
242. Koss L., Czerniak B. et al.: Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: A critical appraisal. *Hum Pathol*, 20:528-548, 1989.
243. Koss L.G., Woyke S. et al.: Thin needle aspiration biopsy of the prostate. *Urol Clin North Am*, 11:237-31, 1984.
244. Kramer S.A., Cline W.A. et al.: Prognosis of patients with stage D1 prostatic adenocarcinoma. *J Urol*, 125:817-819, 1981.
245. Kramer, S.A., Spahr, J. et al: Experience with Gleason's histopathologic grading in prostatic cancer. *J Urol*, 124: 223-225, 1980.
246. Krijnen J.L., Bogdanowicz J.F. et al.: The prognostic value of neuroendocrine differentiation in adenocarcinoma of the prostate in relation to progression of disease after endocrine therapy. *J Urol.*, 158:171-174, 1997.
247. Krongrad A., Lai H. et al.: Mortality in prostate cancer. *J Urol*, 156: 1084-1091, 1996.
248. Labasky R.F., Smith J.A.: Management of pain and other symptoms of advanced prostatic cancer. *Sem Urol*, 6:311, 1988.
249. Lane D.P.: p53, guardian of the genome. *Nature*, 358: 15-16 , 1992.

250. Lange D., Bruce W. et al.: Les éléments du diagnostic précoce et du bilan d'extension du cancer prostatique. Résultats fonctionnels de l'intervention radicale. *Ann Urol*, 103-108, 1990.
251. Lange D.P., Crawford L.V.: T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278:261, 1979.
252. Lange P.H., Narayan P.: understaging and undergrading of prostate cancer. *Urology*, 21:113-118, 1983.
253. Larsen M.P., Carter H.B. et al.: Can stage A1 tumor extent be predicted by transurethral resection tumor volume, per cent or grade? A study of 64 stage A1 radical prostatectomies with comparison to prostates removed for stages A2 and B disease. *J Urol*, 146:1059-1063, 1991.
254. Lee F., Littrup P.J. et al.: Prostate cancer: comparison of transrectal US and digital rectal examination for screening. *Radiology*, 168:389, 1988.
255. Leistenschneider W., Nagel R.: *Atlas of Prostatic Cytology: Techniques and Diagnosis*. Berlin: Springer-Verlag, 82, 1985.
256. Lieber, M.M.: Epidemiological importance of the genetic evolution and pathogenesis of prostate cancer. In: Garraway M.- *Epidemiology of prostate disease*. New York: Springer Verlag, 185-192, 1995.
257. Lieber M.M., Murtaugh P.A. et al.: DNA ploidy and surgically treated prostate cancer. *Cancer*, 75:1935-43, 1995.
258. Linzer D.I., Levine A.J.: Characterization of a 54 K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 17:43, 1979.
259. Lippert M.C., Bensimon H. et al.: Immunoperoxidase staining of acid phosphatase in human prostatic tissue. *J Urol*, 128:1114-1116, 1982.
260. Lo J., Kerns B. et al.: Correlation of DNA ploidy and histologic diagnosis from prostate core-needle biopsies: is DNA ploidy more sensitive than histology for the diagnosis of carcinoma in small specimens?. *J Surg Oncol*, 63:41-45, 1996.
261. López A.: Patología molecular del cáncer de próstata y sus lesiones precursoras ( Simposio de cáncer de próstata y lesiones precursoras). *Rev Esp Patología*, 29:187-190, 1996.
262. Lowe F.C., Trauzzi S.J.: Prostatic acid phosphatase in 1993: its limited clinical utility. *Urol Clin N Amer*, 20:589, 1993.

263. Lundberg S., Carstensen J. et al.: DNA flow-cytometry and histopathological grading of paraffin-embedded prostate biopsy specimens in a survival study. *Cancer Res*, 47:1973-1977, 1987.
264. Lundgren R., Heim S. et al.: Chromosome abnormalities are associated with unfavorable outcome in prostatic cancer patients. *J Urol*, 147:784-788, 1992.
265. Lloyd, S.N., Johnson, C.P. et al.: Nucleolar organizer regions in benign and malignant prostatic disease. *Histopathology*, 18:449-452, 1991.
266. Macoska J.A., Powell I.J. et al.: Loss of the 17 p chromosomal region in a metastatic carcinoma of the prostate. *J Urol*, 147:1142-1146, 1992.
267. Mamaeva S., Lundgren R. et al.: AgNOR staining in benign hyperplasia and carcinoma of the prostate. *Prostate*, 18:155-162, 1991.
268. Martinez J., Gerotgoff I. et al: Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p 53 protein. *J Genes Dev*, 5:151, 1991.
269. Matzkin H., Soloway M.S. et al.: Prognostic factors in stage D2 prostate cancer treated with a pure non-steroidal antiandrogen. *Cancer*, 72:1286, 1993.
270. Maygarden S.J., Strom S. et al.: Localization of epidermal growth factor receptor by immunohistochemical methods in human prostatic carcinoma, prostatic intraepithelial neoplasia, and benign hyperplasia. *Arche Pathol Lab Med*, 116:269-273, 1992.
271. McClinton S., Miller I.D. et al.: An immunohistochemical characterisation of the inflammatory cell infiltrate in benign and malignant prostatic disease. *Br J Cancer*, 61: 400-403, 1990.
272. McIntire T.L., Murphy W.M. et al.: The prognostic value of DNA ploidy combined with histologic substaging for incidental carcinoma of the prostate gland. *Am J Clin Pathol*, 89:370-373, 1988.
273. Mc Kay J., Steel C.M. et al: Allele loss on short arm of chromosome 17 in breast cancer. *Lancet*, 2:1384, 1988.
274. McNeal J.E.: Cancer volume and site of origin of adenocarcinoma in the prostate: relationship to local and distant spread. *Hum Pathol*, 23:258-266, 1992.
275. McNeal J.E., Kindrachuk R.A. et al.: Patterns of progression in prostate cancer. *Lancet*, 1:60-3, 1986.

276. McNeal J.E., Price H.M. et al.: Stage A versus stage B adenocarcinoma of the prostate: morphological comparison and biological significance. *J Urol*, 139:61, 1988.
277. McNeal J.E., Leav I. et al.: Differential lectin staining of central and peripheral zones of prostate and alterations in dysplasia. *Am J Clin Pathol*, 89:41-8, 1988.
278. McNeal J.E., Redwine E.A. et al.: Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma: correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol*, 12:897, 1988.
279. McNeal J.E., Viller A.A. et al.: Capsular penetration in prostate cancer: significance for natural history and treatment. *Am J Surg Pathol*, 14:240-247, 1990.
280. McNeal J.E., Villers A.A. et al.: Histologic differentiation, cancer volume, and pelvic lymph node metastasis in adenocarcinoma of the prostate. *Cancer*, 52:246-251; 66:1225-1233, 1990.
281. Medina V.: Efecto protector del Butirato sobre el cáncer de colon. Estudio experimental. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna. Tenerife, 1994.
282. Mellon K., Thompson S. et al.: P 53, C-erb B-2 and the epidermal growth factor receptor in the benign and malignant prostate. *J Urol*, 147:496-499, 1992.
283. Mercer W.F., Amin M. et al.: Wild-type human p53 is antiproliferative in SV-40 transformed hamster cell. *Oncogene*, 5(7):973, 1990.
284. Merkel D.E., Dressler L.G. et al.: Flow cytometry cellular DNA content, and prognosis in human malignancy. *J Clin Oncol*, 5:1690, 1987.
285. Merkel D.E., McGuire W.L.: Ploidy, proliferative activity and prognosis. DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer*, 65: 1194-205, 1990.
286. Mettlin C.J., Murphy G.P. et al.: The national cancer data base report on prostate cancer. *Cancer*, 76:1104, 1995.
287. Mettlin, C., Natarajan, N. et al.: Recent patterns of care of prostate cancer patients in the United States: results from the surveys of the American College of Surgeons Commission on Cancer. *Int Adv Surg Oncol*, 5:277-321, 1982.
288. Middleton R.G., Smith J.A.: Radical prostatectomy for stage B2 prostatic cancer. *J Urol*, 127:702, 1982.
289. Middleton R.G., Smith J.A. et al.: Patient survival and local recurrence rate following radical prostatectomy for prostatic carcinoma. *J Urol*, 136:422-424, 1986.

290. Miller G.J.: Pathologic aspects of prostate cancer : prediction of malignant potential. *Urology (suppl.)*, 34:5-9, 1989.
291. Miller G.J., Cygan J.M.: Morphology of prostate cancer: the effects of multifocality on histological grade, tumor volume and capsule penetration. *J Urol*, 152:1709, 1994.
292. Miller J.I., Ahman F.R. et al: The clinical usefulness of serum prostate specific antigen after hormonal therapy of metastatic prostate cancer. *J Urol*, 147: 956-961, 1992.
293. Miller P.D., Eardley I. et al.: Prostate specific antigen and bone scan correlation in the staging and monitoring of patients with prostatic cancer. *Br J Urol*, 70:295-298, 1992.
294. Miller J., Horsfall D.J. et al.: The prognostic value of deoxyribonucleic acid flow cytometric analysis in stage D2 prostatic carcinoma. *J Urol*, 145:1192-6, 1991.
295. Mills S.E., Fowler J.E.: Gleason histologic grading of prostatic carcinoma: correlations between biopsy and prostatectomy specimens. *Cancer*, 53: 346-349, 1986.
296. Miyake M., Taki T. et al.: Correlation of expression of H/Le(y)/Le(b) antigens with survival in patients with carcinoma of the lung. *New Engl J Med*, 327:14, 1992.
297. Mohler J.L., Partin A.W. et al.: Prediction of prognosis in untreated stage A2 prostatic carcinoma. *Cancer*, 69:511-519, 1992.
298. Montgomery B.T., Nativ O. et al.: Stage B prostate adenocarcinoma: flow cytometric nuclear DNA ploidy analysis. *Arch Surg*, 125:327-31, 1990.
299. Morgan W.R., Bergstralh E.J. et al.: Long-term evaluation of radical prostatectomy as treatment for clinical stage C (T3) prostate cancer. *Urology*, 41:113, 1993.
300. Morote J., Bellmunt J.: Cáncer de próstata: resistencia a la hormonoterapia. Diagnóstico y tratamiento de la recidiva en los tumores urológicos. *Grupo Aula Médica*, 163-179, 1996.
301. Morote J., Vila J. et al.: Valor del antígeno prostático específico como factor pronóstico del cáncer de próstata metastásico. *Actas Urol Esp*, 16:394, 1992.
302. Mostofi F.K.: Grading of prostate carcinoma. *Cancer Chemotherapy Rep*, 59:111-7, 1975.
303. Mostofi F.K., Sesterhenn I.A. et al.: A pathologist's view of prostatic carcinoma. *Cancer*, 71:906, 1993.

304. Mostofi F.K., Sesterhenn I.A. et al.: Prostatic carcinoma: problems in the interpretation of prostatic biopsies. *Hum Pathol*, 23:223, 1992.
305. Mostofi F.K., Sesterhenn I.A. et al.: Histological typing of prostate tumours. Geneva: World Health Organization, 17-21, 1980.
306. Moul J.W., Sesterhenn I.A. et al.: Prostate-specific antigen values at the time of prostate cancer diagnosis in African-American men. *JAMA*, 274:1277, 1995.
307. Mukamel E., deKernion J.B. et al.: Significance of histological prognostic indicators in patients with carcinoma of the prostate. *Br J Urol*, 65:46-50, 1990.
308. Mukamel E., deKernion J.B. et al.: The incidence and significance of seminal vesicle invasion in patients with adenocarcinoma of the prostate. *Cancer*, 59:1535-1538, 1987.
309. Mulders P.F., Dijkman G.A. et al.: Analysis of prognostic factors in disseminated prostatic cancer. An update. Dutch Southeastern Urological Cooperative Group. *Cancer*, 65:2758, 1990.
310. Mulders P.F., Fernandez del Moral P. et al.: Value of biochemical markers in the management of disseminated prostatic cancer. *Eur Urol*, 21:2-5, 1992.
311. Müller H.A., Altenahr E. et al.: Ubeer Klassifikation and Grading des Prostatacarcinoms. *Verh Dtsch Ges Path*, 64:609, 1980.
312. Muntzing J.: DNA determinations for prognosis and therapy control in prostatic cancer. *Semin Oncol*, 10(suppl 3): 16-20, 1983.
313. Murphy G.P., Withmore W.F.: A report of the workshop on the current status of the histologic grading of the prostate cancer. *Cancer*, 44:1490-4, 1979.
314. Myers R.P., Larson-Keller J.J. et al.: Hormonal treatment at time of radical retropubic prostatectomy for stage D1 prostate cancer: results of long-term followup. *J Urol*, 147:910-5, 1992.
315. Nativ O., Myers R.P. et al.: Nuclear deoxyribonucleic acid ploidy and serum prostate specific antigen in operable prostatic adenocarcinoma. *J Urol*, 303-305, 1990.
316. Nativ O., Winkler H.Z. et al.: Stage C prostatic adenocarcinoma: flow cytometric nuclear DNA ploidy analysis. *Mayo Clin Proc*, 64:911-9, 1989.
317. Navone N.M., Troncoso P. et al.: p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 85: 1657-69, 1993.

318. Nemoto R., Hattori K. et al.: S-phase fraction of human prostate adenocarcinoma studied with in vivo bromodeoxyuridine labeling. *Cancer*, 66:509-514, 1990.
319. Nervi C., Badaracco G. et al: Cytokinetic evaluation in human head and neck cancer by autoradiography and DNA cytofluorometry. *Cancer*, 45:452, 1980.
320. Newell G.R., Poblack E.S.: Incidence of prostate cancer and marital status. *J Natl Cancer Inst*, 79:259-62, 1987.
321. Nielsen K., Berild G.H. et al.:The prognostic value of histological grading and mean nuclear volume in human prostatic cancer. *Prostate*, 21:53, 1992.
322. Nielsen K., Ovegaard J. et al.: Histological grade, DNA ploidy and mean nuclear volume as prognostic factors in prostatic cancer. *Acta Path Microbiol Immunol Scand*, 101:614, 1993.
323. Oesterling J.E.: Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol*, 145:907-23, 1991.
324. Oesterling J.E.: Prostate-specific antigen: a valuable clinical tool. *Oncology*, 5:107-22, 1991.
325. Oesterling J.E., Brendler C.B. et al.: Correlation of clinical stage, serum prostatic acid phosphatase and preoperative Gleason grade with final pathological stage in 275 patients with clinically localized adenocarcinoma of the prostate. *J Urol*, 138:92-98, 1987.
326. Oesterling J.E., Hauzeur C.G. et al.: Small cell anaplastic carcinoma of the prostate: A clinical, pathological and immunohistological study of 27 patients. *J Urol*, 147:807, 1992.
327. Oesterling J.E., Martin S.K. et al.:The use of prostate-specific antigen in staging patients with newly diagnosed prostate cancer. *JAMA*, 269:57-60, 1993.
328. Oishi K, Okada K. et al: A case control study of prostatic cancer in Kyoto, Japan: Sexual factors. *Prostate*,17:269-79, 1990.
329. Oramas J. Factores pronósticos en el cáncer de ovario: papel del contenido de ADN por citometría de flujo. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna. Tenerife, 1996.
330. Oren M.: p53: The ultimate tumor suppressor gene? *FASEB J* , 6:3169-3176, 1992.

331. Palazzo J.P., Ellison D. Y et al.: DNA content in prostate adenocarcinoma. Correlation with Gleason score, nuclear grade and histologic subtypes. *J Urol Pathol*, 1:283-292, 1993.
332. Palken M., Cobb O.E. et al.: Prostate cancer: correlation of digital rectal examination, transrectal ultrasound and prostate specific antigen levels with tumor volumes in radical prostatectomy specimens. *J Urol*, 143:1155-1162, 1990.
333. Partin A.W., Borland R.N. et al.: Influence of wide excision of the neurovascular bundle(s) on prognosis in men with clinically localized prostate cancer with established capsular penetration. *J Urol*, 150:142, 1993.
334. Partin A.W., Carter H.B. et al.: Prostate specific antigen in the staging of localized prostate cancer: influence of tumor differentiation, tumor volume and benign hyperplasia. *J Urol*, 143:747-752, 1990.
335. Partin A.W., Epstein J.I. et al.: Morphometric measurement of tumor volume and per cent of gland involvement as predictors of pathological stage in clinical stage B prostate cancer. *J Urol*, 141:341-345, 1989.
336. Partin A.W., Lee B.R. et al.: Radical prostatectomy for high grade disease: a reevaluation 1994. *J Urol*, 151:1583, 1994.
337. Partin A.W., Steinberg G.D. et al.: Use of nuclear morphometry, Gleason histologic scoring, clinical stage, and age to predict disease-free survival among patients with prostate cancer. *Cancer*, 70:161, 1992.
338. Partin A.W., Walsh P.C. et al.: A comparison of nuclear morphometry and Gleason grade as a predictor of prognosis in stage A2 prostate cancer: a critical analysis. *J Urol*, 142:1254-1258, 1989.
339. Partin A.W., Yoo J. et al.: The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathologic stage in men with prostate cancer. *J Urol*, 150:110, 1993.
340. Paulson D.F.: Impact of radical prostatectomy in the management of clinically localized disease. *J Urol*, 152:1826, 1994.
341. Paulson D.F., Moul J.W. et al.: Radical prostatectomy for clinical stage T1-2NOMO prostatic adenocarcinoma: long-term results. *J Urol*, 144: 1180-1184, 1990.
342. Paulson D.F., Piserchia P.V. et al.: Predictors of lymphatic spread in prostatic adenocarcinoma: Uro-oncology research group study. *J Urol*, 123:697-699, 1980.
343. Paulson D.F., Stone A.R. et al.: Radical prostatectomy: anatomical predictors of success or failure. *J Urol*, 136:1041-1043, 1986.

344. Pearle M.S., Oyasu R. et al.: Touch preparation cytological evaluation of radical prostatectomy specimens. *J Urol*, 152:124, 1994.
345. Pedersen K.V., Carlsson P. et al.: Screening for carcinoma of the prostate by digital rectal examination in a randomly selected population. *Br Med J*, 300:1041-4, 1990.
346. Perez C.A., García D. et al.: Factors influencing outcome of definitive radiotherapy for localized carcinoma of the prostate. *Radiother Oncol.*, 16:1-21, 1989.
347. Persons D.L., Takkai K. et al.: Comparison of fluorescence in situ hybridization with flow cytometry and static image analysis in ploidy analysis of paraffin-embedded prostate adenocarcinoma. *Hum Pathol*, 25:678, 1994.
348. Pflug B.R., Onoda M. et al.: Reduced expression of the low affinity nerve growth factor receptor in benign and malignant prostate tissue and loss of expression in four human metastatic prostate tumor cell lines. *Cancer Res*, 52:5403-5406, 1992.
349. Pilepich M.V., Krall J.K. et al.: Prognostic factors in carcinoma of the prostate-analysis of RTOG study 75-06. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 13:339-349, 1987.
350. Pilepich M.V., Perez C.A. et al.: Prognostic parameters in radiotherapeutic management of localized carcinoma of the prostate. *J Urol*, 124:485-487, 1980.
351. Poddighe P.J., Ramackers F.C.S. et al.: Structural chromosome 1 aberrations in transitional cell carcinoma of the bladder; interphase cytogenetics combining a centromeric, telomeric and library DNA probe. *Cancer Res*, 52:4929-4934, 1992.
352. Pollack A., Zagars G.K. et al.: Near-Diploidy: a new prognostic factor for clinically localized prostate cancer treated with external beam radiation therapy. *Cancer*, 73:1895, 1994.
353. Pontes J.E., Eisenkraft S. et al.: Pre-operative evaluation of localized prostatic carcinoma by transrectal ultra-sonography. *J Urol*, 134: 289-291, 1985.
354. Pontes J.E., Wajsman Z. et al.: Prognostic factors in localized prostatic carcinoma. *J Urol*, 134:1137-1139, 1985.
355. Prout G.R., Heaney J.A. et al.: Nodal involvement as a prognostic indicator in patients with prostatic carcinoma. *J Urol*, 124:226-231, 1980.
356. Rana A., Chishalm G.D. et al.: Audit and its impact in the management of early prostatic cancer. *Brit J Urol*, 71:721, 1993.
357. Remmele W., Weber A. et al.: Primary signet-ring cell carcinoma of the prostate. *Hum Pathol*, 19:478-480, 1988.

358. Rioja L.A., Sanz J.I. et al.: Carcinoma de próstata. En: Jimenez Cruz J.F.- Tratado de Urología. Barcelona: J.R. Prous Editores, Vol II: 1205-1235, 1993.
359. Ritchie A.W., Dorey F. et al.: Relationship of DNA- content to conventional prognostic factors in clinically localized carcinoma of the prostate. *Br J Urol*, 62:245-260, 1986.
360. Ritter M.A., Messing E.M. et al.: Prostate-specific antigen as a predictor of radiotherapy response and patterns of failure in localized prostate cancer. *J Clin Oncol*, 10:1208-17, 1992.
361. Ro JY, El-Naggar A. et al.: Signet-ring-cell carcinoma of the prostate: Electron-microscopic and immunohistochemical studies of eight cases. *Am J Surg Pathol*, 12:453-460, 1988.
362. Ro JY, Grignon D.J. et al.: Mucinous adenocarcinoma of the prostate: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Pathol*, 21:593-600, 1990.
363. Rodin AE., Larson DL. et al.: Nature of perineural space invaded by prostate carcinoma. *Cancer*, 20:1771-9, 1967.
364. Rosai J.: *Ackerman's Surgical Pathology*. 8<sup>th</sup> ed. St Louis: Ed. Mosby, 1626, 1996.
365. Rubin S.J., Hallahan D.E. et al.: Two prostate carcinoma cell lines demonstrate abnormalities in tumor suppressor genes. *J Surg Oncol*, 46: 31-36, 1991
366. Rudoni M., Antonini G. et al.: The clinical value of prostate-specific antigen and bone scintigraphy in the staging of patients with newly diagnosed, pathologically proven prostate cancer. *Eur J Nucl Med*, 22:207-211, 1995.
367. Ruckle H.C., Klee G.G. et al.: Prostate-specific antigen: concepts for staging prostate cancer and monitoring response to therapy. *Mayo Clin Proc*, 69:69, 1994.
368. Ruckle H., Oesterling J.E. et al.: Relationship of high pre-prostatectomy prostate specific antigen (PSA) levels to postoperative PSA levels and outcome in prostate cancer. *J Urol*, 151:340, 1994.
369. Ruizeveld de Winter J.A., Trapman J. et al.: Androgen receptor heterogeneity in human prostatic carcinomas visualized by immunohistochemistry. *J Pathol*, 160:329-332, 1990.
370. Ryan D.H., Fallon M.A. et al : Flow cytometry in the clinical laboratory. *Clin Chim Acta*, 171:125, 1988.
371. Sakai H., Shiraishi K. et al.: Immunohistochemical prostatic acid phosphatase level as a prognostic factor of prostatic carcinoma. *Prostate*, 19:265-72, 1991.

372. Salomon C.G., Flisak M.E. et al.: Radical prostatectomy transrectal sonographic evaluation to asses for local recurrence. *Radiology*, 189:713, 1993.
373. Sanz J.I., Gonzalvo A. et al.: Diagnóstico de las recidivas del cáncer de próstata tras tratamiento radical. Diagnóstico y tratamiento de la recidiva en los tumores urológicos. *Grupo Aula Médica*, 131-144, 1996.
374. Sassine A.M., Schulman C.: Clinical use of prostate-specific antigen in the staging of patients with prostatic carcinoma. *Eur Urol*, 23:348-351, 1993.
375. Sawada R., Tsuboi S. et al.: Differential E-selectin-dependent adhesion efficiency in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. *J Biol Chem*, 269:1425, 1994.
376. Scaletscky R., Koch M.O. et al.: Tumor volume and stage in carcinoma of the prostate detected by elevations in prostate specific antigen. *J Urol*, 152:129-131, 1994.
377. Schiffman R.B., Abmann F.R. et al.: Analytical and physiological characteristics of prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase in serun compared. *Clin Chem*, 33:2086, 1987.
378. Scardino P.T.: Early detection of prostate cancer. *Urol Clin North Am*, 16:635, 1989.
379. Schild S.E., Buskirk S.J. et al.: The results of radiotherapy for isolated elevation of serum PSA levels following radical prostatectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 23:141-145, 1992.
380. Schmid H.P., McNeal J.E. et al.: Observations on the doubling time of prostate cancer. The use of serial prostate-specific antigen in patients with untreated disease as a measure of increasing cancer volume. *Cancer*, 71:2031-2040, 1993.
381. Schmidt J.D.: Clinical diagnosis of prostate cancer. *Cancer*, 221-224, 1992.
382. Schroeder F.H., Blom J.H.M. et al.: Grading of prostatic cancer: II. The prognostic significance of the presence of multiple architectural patterns. *Prostate*, 6:403-415, 1985.
383. Schroeder F.H., Hop W.C.J. et al.: Grading of prostate cancer: III. Multivariate analysis of prognostic parameters. *Prostate*, 7:13-20, 1985.
384. Schultz RE., Varello MA. et al.: Simultaneous flow cytometric deoxyribonucleic acid and acid phosphatase analysis of benign and malignant lesions of the prostatee. *J Urol*, 134:1133-1136, 1985.

385. Scrivner D.L., Meyer J.S. et al: Cell kinetics by bromodeoxyuridine labeling and deoxyribonucleic acid ploidy in prostatic carcinoma needle biopsies. *J Urol*, 146:1034-1039, 1991.
386. Sesterhenn I. A., Mostofi F.K. et al.: Image analysis of nucleoli and nucleolar organizer regions in prostatic hyperplasia, intraepithelial neoplasia, and prostatic carcinoma. *J Urogen Pathol*, 1:61-74, 1991.
387. Shandberg A.A.: Chromosomal abnormalities and related events in prostate cancer. *Hum Pathol*, 23:368-380, 1992.
388. Shankey T.V., Kallioniemi O-P. et al.: Consensus review of the clinical utility of DNA content cytometry in prostate cancer. *Cytometry*, 14:497-500, 1993.
389. Shannon R.L., Ro J.Y. et al.: Sarcomatoid carcinoma of the prostate: a clinicopathologic study of 12 patients. *Cancer*, 69:2676-2682, 1992.
390. Shevchuk M.M., Romas N.A. et al.: Acid phosphatase localization in prostatic carcinoma: a comparison of monoclonal antibody to heteroantisera. *Cancer*, 52:1642-1646, 1983.
391. Shih W.J., Wierzbinski B. et al.: Correlation of prostate-specific antigen and technetium -99- HMDP bone imaging. *Clin Nucl Med*, 14:750-755, 1989.
392. Shipley W.V., Prout G.R. et al.: Radiation therapy for localized prostate carcinoma: experience at the Massachusetts General Hospital (1973-1981). *NCI Monogr.*, 7:67-73, 1988.
393. Shurbaji M.S., Kalbfleisch J.H. et al.: Immunohistochemical detection of p53 protein as a prognostic indicator in prostate cancer. *Hum Pathol*, 26:106-109, 1995.
394. Shurbaji M.S., Kuhajda F.P. et al.: Expression of oncogenic antigen 519 (OA-519) in prostatic cancer is a potential prognostic indicator. *Am J Clin Pathol*, 97:686-691, 1992.
395. Silverberg E., Boring CC. et al.: Cancer statistics 1990. *CA Cancer J Clin*, 40:9-26, 1990.
396. Sinha A.A., Gleason D.F. et al.: Relationship of prostatic acid phosphatase localization in human prostate by a monoclonal antibody with the Gleason grading system. *Prostate*, 13:1-15, 1988.
397. Slack N.H., Brady M.F. et al.: Prostatic carcinoma. Treated at a categorical center, 1970-1979. *N.Y. State J Med*, 83:699-705, 1983.

398. Smith J.A., Middleton R.G.: Implications of volume of nodal metastasis in patients with adenocarcinoma of the prostate. *J Urol*, 133:617-619, 1985.
399. Smith J.A., Scaletscky R.: Future directions in tumor marker technology for prostate cancer. *Urol Clin N Amer*, 20:771, 1993.
400. Smith J.A., Lange P.H. et al.: Serum markers as a predictor of response duration and patient survival after hormonal therapy for metastatic carcinoma of the prostate. *J Urol*, 157:1329-1334, 1997.
401. Smith M.J.V.: The lymphatics of the prostate. *Inves Urol*, 3:439-444, 1966.
402. Soini Y., Paakko P. et al.: Comparative analysis of p53 protein immunoreactivity in prostatic, lung and breast carcinomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 421:223-228, 1992.
403. Song J., Cheng W.S. et al.: Nuclear deoxyribonucleic acid content measured by static cytometry important prognostic association for patients with clinically localized prostate carcinoma treated by external beam radiotherapy. *J Urol*, 147:794-7, 1992.
404. Sorensen F.B.: Quantitative analysis of nuclear size for objective malignancy grading: a review with emphasis on new, unbiased stereologic methods. *Lab Invest*, 66:4, 1992.
405. Spitz M.R., Currier R.D.: Familial patterns of prostate cancer: a case control analysis. *J Urol*, 146:1305-7, 1991.
406. Stamey T.A. et al: Morphometric and clinical studies on 68 consecutive radical prostatectomies. *J Urol*, 139:1235-1241, 1988.
407. Stamey T.A., McNeal J.E.: Adenocarcinoma of the prostate. In: Walsh P.C. et al.-*Campbell's Urology*, 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, Vol. II: 1159-1221, 1992
408. Stamey T.A., McNeal J.E. et al.: Morphometric and clinical studies on 68 consecutive radical prostatectomies. *J Urol*, 139:1235-1241; 1175-1189, 1988.
409. Stamey T.A., Villers A.A. et al.: Positive surgical margins at radical prostatectomy: Importance of the apical dissection. *J Urol*, 143:1166-1173, 1990.
410. Stamey T.A., Yang N. et al.: Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *New Engl J Med*, 317:909, 1987.
411. Stege R., Lundh B. et al.: Deoxyribonucleic acid ploidy and the direct assay of prostatic acid phosphatase and prostate specific antigen in fine needle aspirations biopsies and diagnostic methods in prostatic carcinoma. *J Urol*, 144: 299-302, 1990.

412. Steilen H., Ketter R. et al.: DNA aneuploidy in prostatic adhocarcinoma: a frequent event as shown by fluorescence in situ DNA hybridization. *Hum Pathol*, 25:1306, 1994.
413. Stein A., deKernion J.B. et al.: Prostate specific antigen levels after radical prostatectomy in patients with organ confined and locally extensive prostate cancer. *J Urol*, 147:942-946, 1992.
414. Steinberg G.D., Carter B.S.: Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate*, 17:337-47, 1990.
415. Steinberg G.D., Epstein J.I. et al.: Management of stage D1 adenocarcinoma of the prostate: the Johns Hopkins experience 1974-1987. *J Urol*, 144:1425-1432, 1990.
416. Stephenson R.A., James B.C. et al.: Flow cytometry of prostate cancer: Relationship of DNA content to survival. *Cancer Res*, 47:2504-2509, 1987.
417. Strang P, Eklund G. et al: S-phase rate as a predictor of early recurrences in carcinoma of the uterine cervix. *Anticancer Res*, 7: 807, 1987.
418. Sutton M.A., Gibbons R.P. et al.: Is deleting the digital rectal examination a good idea? *West J Med*, 155:43-6, 1991.
419. Svanholm H., Mygrind H.: Prostatic carcinoma reproducibility of histologic grading. *Acta Path Microbiol Immunol Scand*, 93:67-71, 1985.
420. Takahashi S., Qian J. et al.: Potential markers of prostate cancer aggressiveness detected by fluorescence in situ hybridization in needle biopsies. *Cancer Res*, 54:3574-3579, 1994.
421. Takai K., Goellner J.R. et al.: Static image and flow DNA cytometry of prostatic adenocarcinoma: studies of needle biopsy and radical prostatectomy specimens. *J Urol Pathol*, 2:39-48, 1994.
422. Tannenbaum M., Tannenbaum S. et al.: Prognostic significance of nucleolar surface area in prostate cancer. *Urology*, 19:546-551, 1982.
423. Tavares A.S., Costa J. et al.: Correlation between ploidy and prognosis in prostatic carcinoma. *J Urol*, 109:676-679, 1973.
424. Taylor I.W., Musgrove E.A. et al: The influence of age on the DNA levels of breast. *Eur J Cancer Oncol*, 19:623, 1983.
425. Ten Kate F.J.W. et al.: Problems in grading of prostatic carcinoma: interobserver reproducibility of five different grading systems. *World J Urol*, 4:147-152, 1986.

426. Terris M.K., Klonecke A.S. et al.: Utilization of bone scans in conjunction with prostate-specific antigen levels in the surveillance for recurrence of adenocarcinoma after radical prostatectomy. *J Nucl Med*, 32:1713-1717, 1991.
427. Terris M.K., McNeal J.E. et al.: Efficacy of transrectal ultrasound-guided seminal vesicle biopsies in the detection of seminal vesicle invasion by prostate cancer. *J Urol*, 149:1035, 1993.
428. Terz J.J., Curutchet H.P. et al.: Analysis of the cell kinetics of human solid tumors. *Cancer*, 28:1100, 1971.
429. Thorad E., Fosse S. et al.: Flow cytometric DNA pattern in relation to clinical and histopathologic characteristics. *Cancer*, 57:808-811, 1986.
430. Trachtenberg J., Walsh P.C.: Correlation of prostatic nuclear androgen receptor content with duration of response and survival following hormonal therapy in advanced prostatic cancer. *J Urol*, 127:466-471, 1982.
431. Traspasso J.G., Dekernion J.B. et al.: The incidence and significance of detectable levels of serum prostate specific antigen after radical prostatectomy. *J Urol*, 152:1821, 1994.
432. Tribukait B.: DNA flow cytometry in carcinoma of the prostate for diagnosis, prognosis and study of tumor biology. *Acta Oncol*, 30:187-92, 1991.
433. Tribukait B.: Flow cytometry in assessing the clinical aggressiveness of genitourinary neoplasms. *World J Urol*, 5:108, 1987.
434. Tribukait B.: Flow cytometry in surgical pathology and cytology of tumors of the genito-urinary tract. In: Koss L.G. and Coleman D.V.- *Advances in Clinical Cytology*. New York: Masson Publishers, Vol II, 163, 1984.
435. Tribukait B.: Rapid flow cytometry of prostatic fine needle aspiration biopsies. In: Karr J.P. et al.- *Prognostic Cytometry and Cytopathology of Prostate Cancer*. New York: Elsevier Science Publishing Company, 236-42, 1989.
436. Tribukait B., Esposti P.L. et al.: Tumour ploidy for characterization of prostatic carcinoma: Flow cytofluorometric DNA studies using aspiration biopsy material. *Scand J Urol Nephrol*, 55: 59-64, 1980.
437. Tsai Y.C., Nichols P.W. et al.: Allelic losses of chromosome 9,11 and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res*, 50:44, 1990.
438. Vallencien G., Prapotnich D. et al.: Does seminal vesicle biopsy improve the preoperative staging of prostatic cancer? *Eur Urol (suppl. 1) IX Congress, EAU*:433, 1990.

439. Van Aubel O.G.J.M., Bolt-de Vries J. et al.: Nuclear androgen receptor content in biopsy specimens from histologically normal, hyperplastic, and cancerous human prostatic tissue. *Prostate*, 6:185-194, 1985.
440. Van den Ouden D., Bentvelsen F.M. et al.: Positive margins after radical prostatectomy: correlation with local recurrence and distant progression. *Brit J Urol*, 72:489, 1993.
441. Van den Ouden D., Davidson P.J.T. et al.: Radical prostatectomy as a monotherapy for locally advanced (stage T3) prostate cancer. *J Urol*, 151:646, 1994.
442. Van der Poel H.G., Schaafsma H.E. et al.: Quantitative light microscopy in urological oncology. *J Urol*, 148:1-13, 1992.
443. Varki A.: Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3:97, 1993.
444. Vera-Román J.M.: Uso de la citometría de flujo en la oncología actual. *Med Clin*, 88:544, 1987.
445. Villers A.A., McNeal J.E. et al.: Development of prostatic carcinoma. Morphometric and pathologic features of early estages. *Acta Oncol*, 30:145-151, 1991.
446. Villers A.A., McNeal J.E. et al.: Pathogenesis and biological significance of seminal vesicle invasion in prostatic adenocarcinoma. *J Urol*, 143:1183-1187, 1990.
447. Villers A., McNeal J.E. et al.: The role of perineural space invasion in the local spread of prostatic adenocarcinoma. *J Urol*, 142:763, 1989.
448. Visakorpi T., Kallioniemi O.P. et al.: Small subgroup of aggressive, highly proliferative prostatic carcinomas defined by p53 accumulation. *J Natl Cancer Inst*, 24:883-887, 1992.
449. Visakorpi T., Kallioniemi O.P. et al.: Expression of epidermal growth factor receptor and erbb 2 (Her-2/neu) oncoprotein in prostatic carcinomas. *Mod Pathol*, 5:643-648, 1992.
450. Viswanath S., Palmer M.A. et al.: Routine estimation of prostate specific antigen prior to clinic attendance in patients with symptoms of bladder outlet obstruction. *Br J Urol*, 72:187-189, 1993.
451. Vogelstein B., Fearon E.R. et al: Genetics alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319:525, 1988.

452. Voges G.E., McNeal J.E. et al.: Morphologic analysis of surgical margins with positive findings in prostatectomy for adenocarcinoma of the prostate. *Cancer*, 69:520-526, 1992.
453. Voges G.E., McNeal J.E. et al.: The predictive significance of substaging stage A prostate cancer (A1 versus A2) for volume and grade of total cancer in the prostate. *J Urol*, 147: 858-863, 1992.
454. Volm M., Mattern J. et al: Flow cytometric of epidermoid lung carcinomas: Relationship of ploidy and cell cycle phases to survival. A five-year follow-up study. *Anticancer Res*, 8:105, 1988.
455. Walsh P.C.: Why make an early diagnosis of prostate cancer ? *J Urol*, part 2, 147:853, 1992.
- 456 .Walsh P.C., Jewett H.J.: Radical surgery for prostatic cancer. *Cancer*, 45:1906-1911, 1980.
457. Walsh P.C., Partin A.W. et al.: Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years. *J Urol*, 152:1831, 1994.
458. Warzynski M.J., Soechtig C.E. et al.: DNA analysis by flow cytometry of paraffin embedded core biopsies of the prostate. *Prostate*, 24:313-319, 1994.
459. Wasserman N.F., Kapoor D.A. et al.: Transrectal US in evaluation of patients after radical prostatectomy. *Radiology*, 185:367, 1992.
460. Wersto R.P., Liblit R.L. et al. Flow cytometric DNA analysis of human solid tumors: A review of the interpretation of DNA histograms. *Hum Pathol*, 22:1085-1098, 1991.
461. Werston A., Willey J.C. et al: Differential DNA sequence deletions from chromosomes 3, 11, 13 and 17 in squamous-cell carcinoma, large-cell carcinoma, and adenocarcinoma of the human lung. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 86:5099, 1989.
462. Whitmore W.F. .: Natural history and staging of prostate cancer. *Urol Clin N Amer*, 11:205, 1984.
463. Whitmore W.F., Warner J.A. et al.: Expectant management of localized prostatic cancer. *Cancer*, 67:1091, 1991.
464. Wick M.R., Young R.H. et al.: Prostatic carcinosarcomas: Clinical histologic, and immunohistochemical data on two cases, with a review of the literature. *Am J Clin Pathol*, 92:131-139, 1989.

465. Willumsen H., Thorup J. et al.: Nuclear DNA content in prostatic carcinoma measured by flow cytometry: a retrospective study on paraffin-embedded tissue. *APMIS (suppl)*, 96:120-125, 1988.
466. Winkler H.Z., Rainwater L.M. et al.: Stage D1, prostatic adenocarcinoma: significance of nuclear DNA ploidy patterns studied by flow cytometry. *Mayo Clin Proc*, 63:103-112, 1988.
467. Wirth M.P., Müller H.H. et al.: Value of nuclear DNA ploidy patterns in patients with prostate cancer after radical prostatectomy. *Eur Urol*, 20:248-252, 1991.
468. Woodard H.Q.: Quantitative studies of beta-glycerophosphatase activity in normal and neoplastic tissues. *Cancer*, 9:352, 1956.
469. Yogesan K., Albregsten F. et al.: Co-occurrence and run length based texture analysis of experimental liver carcinogenesis in mice. *Proc Scand Conf Image Anal*, 1:227, 1993.
470. Yogesan K., Jorgensen T. et al.: Entropy-based texture analysis of chromatin structure in advanced prostate cancer. *Cytometry*, 24:268, 1996.
471. Yokota J., Wada M. et al.: Loss of heterozygosity on chromosomes 3, 13, and 17 in small-cell carcinoma on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 84:9252, 1987.
472. Zagars G.K., von Eschenbach A.C. et al.: Prognostic factors in prostate cancer. Analysis of 874 patients treated with radiation therapy. *Cancer*, 72: 1709-1725, 1993.
473. Zagars G.K., von Eschenbach A.C.: Prostate-specific antigen: an important marker for prostate cancer treated by external beam radiotherapy. *Cancer*, 72 (2): 538-48, 1993.
474. Zincke H., Oesterling J.E. et al.: Long-term (15 years) results after radical prostatectomy for clinically localized (stage T2c or lower) prostate cancer. *J Urol*, 152:1850, 1994.
475. Zincke H., Utz D.C.: Observations on surgical management of carcinoma of prostate with limited nodal metastases. *Urology*, 24:137-145, 1984.
476. Zincke H., Utz D.C. et al.: Bilateral pelvic lymphadenectomy and radical prostatectomy for clinical stage C prostatic cancer. *J Urol*, 135:1199-1205, 1986.
477. Zincke H., Bergstralh E.J. et al.: Stage D1 prostate cancer treated by radical prostatectomy and adjuvant hormonal treatment: evidence for favorable survival in patients with DNA diploid tumors. *Cancer*, 70(1):311-23, 1992.