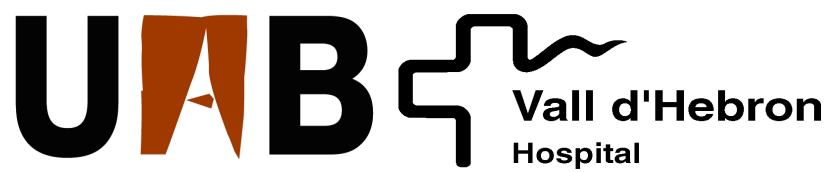


FACULTAT DE MEDICINA  
DEPARTAMENT DE CIRURGIA



## **RANK-L COM A MARCADOR PRONOSTIC EN CANCER DE PROSTATA**

Memòria presentada per Maria Carmen Mir Maresma

per optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia

Directors: Juan Morote Robles, Enrique Trilla Herrera, Ines de Torres

Barcelona, Juliol 2012

El Doctor Juan Morote Robles, Doctor en Medicina i Cirurgia, Professor Titular de Cirurgia de la Universitat Autònoma de Barcelona i Cap de Servei d'Urologia de l'Hospital Vall d'Hebrón de Barcelona,

CERTIFICA:

que el treball "***RANKL com a marcador pronòstic en càncer de pròstata***", presentat per la llicenciada Maria Carmen Mir Maresma per optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia, ha estat realitzat sota la seva direcció i coodirecció pels doctors Enrique Trilla Herrera i Ines Maria de Torres Ramirez, trobant-se en condicions de ser defensat davant del tribunal corresponent.

Barcelona, 4 de Juliol de 2012

Dr. Juan Morote Robles

Enrique Trilla Herrera

Ines Maria de Torres Ramirez

## **AGRAIMENTS**

Voldria donar les gràcies a totes les persones que, d'una manera o altra, m'han ajudat i m'han donat suport en aquesta etapa de la meva vida, i especialment:

Al director d'aquest treball, Juan Morote. Per mantenir la fe en la ciència i en tots nosaltres després de tants anys treballant en aquest camp.

A l'Enric Trilla. Gràcies pels teus consells i pel suport en la realització del treball.

A la Ines de Torres. Gràcies Ines per tot el teu suport i per l'empeny a seguir amb el treball tot i les contrarietats.

A la Marina Rigau. Mai podré agrair-te la teva inacabable paciència i comprensió. Sens dubte aquest treball hauria estat impossible sense la teva inestimable ajuda en tots els àmbits.

A l'Andrew Stephenson, el meu actual cap, per permetre'm deixar en part les meves obligacions per tal de poder finalitzar aquest projecte. Thank you so much.

A tots els meus companys de residència, gràcies al seu suport vaig poder dedicar part del meu temps a aquest tema de recerca.

A tots, Moltes Gràcies.

## **ABREVIATURES**

BAC: bloqueig androgènic complet

CaP: càncer de pròstata

DES: dietilestilbestrol

DHT: dihidrotestosterona

EOD: extention of disease

GnRH: hormona alliberadora de gonadotropina

IMRT: radioteràpia d'intensitat modulada

IHQ: immunohistoquímica

MOD: malaltia òssia disseminada

LH: hormona luteïnant

LHRH: hormona alliberadora d'hormona luteïnant

OPG: osteoprotegerina

PBS; phosphate buffered saline

PSA: antigen específic prostàtic

RANK: receptor activador NK

RANKL: receptor activador NK ligand

RTU: resecció transuretral

SA: supressió androgènica

TAC: tomografia axial computeritzada

3D-CRT: radioteràpia conformada en 3 dimensions

vel-PSA: velocitat de PSA

vel-PSA post: velocitat de PSA post-progressió bioquímica

VPP: valor predictiu positiu

**INTRODUCCIÓ .....15 - 122**

---

---

1. SITUACIÓ EPIDEMIOLÒGICA DEL CÀNCER DE PRÒSTATA.....15 -18

2. DIAGNÒSTIC DEL CÀNCER DE PRÒSTATA.....19 - 26

2.1. Tacte rectal.

2.2. Antigen específic prostàtic (PSA).

2.3. Ecografia transrectal.

2.4. Biòpsia prostàtica.

3. ESTADIFICACIÓ DEL CÀNCER DE PRÒSTATA.....27 - 37

3.1. Estadificació T.

3.2. Estadificació N.

3.3. Estadificació M.

4. TRACTAMENT DEL CÀNCER DE PRÒSTATA.....38 - 57

4.1. Prostatectomia radical.

4.1.1. Càncer de pròstata estadi T1a-T1b.

4.1.2. Càncer de pròstata estadi T1c.

4.1.3. Càncer de pròstata estadi T2.

4.1.4. Càncer de pròstata estadi T3.

4.1.5. Càncer de pròstata amb afectació limfàtica.

4.2. Radioteràpia.

4.2.1. Càncer de pròstata localitzat. Estadi T1-T2c N0 M0.

4.2.2. Tractament amb radioteràpia postoperatòria immediata en els tumors amb estadi patològic T3 N0 M0.

4.2.3. Tractament amb radioteràpia del càncer de pròstata localment avançat, estadi T3-T4 N0 M0, T1-T4 N1 M0.

4.2.4. Tractament hormonal neoadjuvant.

4.2.5. Tractament hormonal concomitant i adjuvant.

4.2.6. Tractament hormonal adjuvant.

4.2.7. Tractament hormonal neoadjuvant, concomitant i adjuvant.

## 5. TRACTAMENT DEL CÀNCER DE PRÒSTATA METASTÀTIC.....58 - 77

5.1. Biologia i morfologia cel·lular de les cèl·lules prostàtiques.

5.2. Efecte dels andrògens sobre el desenvolupament de les cèl·lules epitelials prostàtiques.

5.2.1. Regulació androgènica.

5.2.2. Castració i administració de testosterona.

5.3. Tipus de supressió androgènica.

5.3.1. Castració quirúrgica.

5.3.2. Estrògens.

5.3.3. Agonistes LHRH.

5.3.3.1. Per què utilitzem agonistes LHRH?

5.3.3.2. Agonistes LHRH i tipus.

5.3.4. Antiandrògens.

5.4. Bloqueig androgènic complert versus agonistes LHRH.

5.5. Quan hem d'iniciar el tractament amb supressió androgènica?

5.6. Indicacions del tractament amb supressió androgènica.

## 6. BIOLOGIA DE L'OS NORMAL.....78 - 91

6.1. Formació d'os normal.

6.2. Remodelació òssia.

6.3. Regulació de la formació i activació dels osteoclasts amb el sistema OPG/RANK/RANKL.

6.4. RANKL.

6.5. RANK.

6.6. OPG.

6.7. Paper de RANKL-RANK-OPG en altres sistemes.

## 7. PATOFISIOLOGIA DE LES METATASIS OSSIES.....92 - 109

7.1. Com es donen les metàstasis.

7.2. Factors involucrats en el desenvolupament de metàstasis blàstiques.

7.2.1 Factors implicats en l'estimulació de la formació d'osteoclasts en metàstasis osteoblàstiques.

7.2.2 Factors implicats en l'estimulació de la formació d'os en les metàstasis osteoblàstiques.

8. MARCADORS DE REMODELACIO OSSIA.....110 - 118

8.1. Marcadors de formació òssia.

8.2. Marcadors de degradació òssia.

8.2.1. Productes de la síntesi d'osteoclasts: fosfatasa àcida tartar resistent.

8.2.2. Productes de la degradació de la matriu mineral, calci urinari.

8.2.3. Productes de la degradació de col·lagen.

8.3. Correlació dels marcadors ossis amb les troballes clíniques.

9. ACTUALITZACIO BIBLIOGRAFICA DE L'ESTUDI EXPRESSIO IMMUNOHISTOQUIMICA DE RANKL .....119 - 122

**HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS .....123 - 125**

---

---

**MATERIAL I MÈTODES.....127 - 140**

---

---

1. MATERIAL .....127 - 132

1.1. Grup estudi.

1.2. Grup control.



2. METODES.....133 - 140

- 2.1. Paràmetres clínico-patològics.
- 2.2. Tècnica tinció immunohistoquímica RANKL.
- 2.3. Tècnica de detecció de l'anticòs de RANKL amb immunoassaig (Western Blot).
- 2.4. Estudi estadístic.

**RESULTATS .....142 - 156**

---

---

- 1. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ IHQ DE RANKL SEGONS L'EXISTÈNCIA DE METÀSTASIS ÒSSIES
- 2. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ IHQ DE RANKL SEGONS L'EXTENSIÓ DE LA MALALTIA ÒSSIA
- 3. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ IHQ DE RANKL EN FUNCIÓ DE LA CLASSIFICACIÓ DE RISCS
- 4. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ IHQ DE RANKL SEGONS EL TIPUS DE METÀSTASI
- 5. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ IHQ DE RANKL COM A PREDICTOR DE METÀSTASIS ÒSSIES
- 6. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ IHQ DE RANKL COM A PREDICTOR DE METÀSTASIS ÒSSIES
- 7. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ IHQ DE RANKL COM A MARCADOR DE DISSEMINACIÓ METASTÀTICA

8. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ IHQ DE RANKL COM A MARCADOR DE SUPERVIVÈNCIA

9. ANÀLISI DE L'ANTICÒS UTILITZAT PER MÈTODE WESTERN BLOT

**DISCUSSIÓ .....157 - 172**

---

---

**CONCLUSIONS .....173 - 175**

---

---

**REFERENCIES .....**

**176 - 218**

---

---

## LLISTAT DE FIGURES

Figura 1. La pròstata està formada per un compartiment estromal i un compartiment epitelial, separats per la membrana basal. Extret de Schalken et al 2005.

Figura 2. Tant la testosterona (T) com la DHT produeixen un efecte directe sobre la diferenciació de les cèl·lules epitelials, i un efecte indirecte sobre la proliferació cel·lular a través de l'alliberament de factors de creixement per part de l'estroma prostàtic. Extret de Schalken et al 2005.

Figura 3. Transducció de senyals en relació a RANKL. Adaptat de Boyce F, Xing L. Function of RANKL-RANK-OPG in bone modelling and remodelling.

Figura 4. Representació esquemàtica de la interacció RANKL-RANK-OPG.

Figura 5. Representació esquemàtica de les interaccions cel·lulars en l'entorn de l'os. Adaptat del llibre Prostate Cancer, Capítol 12, Pàgina 13.

Figura 6. Patofisiologia de les metàstasis òssies.

Figura 7. Mostres de tincions immunohistoquímiques de RANKL.

Figura 8. Western Blot amb l'anticòs utilitzat per la tinció IHQ.

Figura 9. Anàlisi comparatiu entre l'expressió immunohistoquímica de RANKL en malalts amb CaP metastàtic i no metastàtic.

Figura 10. Anàlisi d'expressió de RANKL en funció de la quantitat de metàstasis òssies.

Figura 11. Anàlisi de l'expressió immunohistoquímica de RANKL en funció del risc de disseminació metastàtica i en pacients amb CaP metastàtic.

Figura 12. Anàlisi de l'expressió immunohistoquímica de RANKL en funció del tipus de metàstasi.

Figura 13. Anàlisi de supervivència global en pacients amb CaP.

Figura 14. Diagrama de la interacció entre RANKL, osteoclasts i osteoblasts.

## **LLISTAT DE TAULES**

Taula 1. Valor de PSA i risc de CaP. Extret de Catalona et al 1994.

Taula 2. Risc de CaP en relació a valors baixos de PSA. Extret de Thompson et al 2004.

Taula 3. Comparació de les classificacions TNM de 1992, 2002, i de Jewett-Whitmore. Extret de Greene et al 2002.

Taula 4. Extensió de la malaltia òssia segons Soloway et al 1992.

Taula 5. Estimació del risc de recurrència tumoral per CaP clínicament localitzat i localment avançat.

Taula 6. Tipus de marcadors ossis.

Taula 7. Característiques de les variables clinicopatològiques incloses en el grup estudi.

Taula 8. Sistema de gradació semi-quantitatiu per l'avaluació del volum de metàstasi òssia segons Soloway et al.

Taula 9. Característiques de les variables clinicopatològiques incloses en el grup control.

Taula 10. Criteris de d'Amico.

Taula 11. Anàlisi multivariant per a factors predictors de metàstasi òssia.

Taula 12. Anàlisi multivariant per a factors predictors de metàstasi global.

Taula 13. Anàlisi multivariant per a factors predictors de metàstasis limfàtiques.

Taula 14. Anàlisi de regressió logística de Cox per a factors pronòstics de supervivència.

## INTRODUCCIÓ

---

## 1. SITUACIÓ EPIDEMIOLÒGICA DEL CÀNCER DE PRÒSTATA

El càncer constitueix un dels problemes sanitaris més importants a la nostra societat, tant en termes de morbimortalitat com d'impacte social, econòmic i sobre la qualitat de vida, afectant a una de cada tres persones al llarg de la seva vida [1].

El càncer de pròstata (CaP) és una neoplàsia poc freqüent en homes menors de 50 anys, si bé a partir d'aquesta edat, la seva incidència augmenta més ràpidament que la de qualssevol altre neoplàsia. Si excloem el càncer superficial de pell, el CaP és el tumor més freqüent en els homes majors de 50 anys. La incidència de CaP a Espanya és, junt amb Grècia, de les més baixes de la Unió Europea. En el període 1997-2000 s'ha estimat a Espanya una incidència de CaP de 13212 casos nous cada any, amb una taxa ajustada de 56.29 per cada 100000 habitants (població estàndard europea) [2]. A Espanya, en els últims anys, el CaP s'ha col·locat en el tercer lloc com a causa de mort per càncer en els homes, per darrera del càncer de pulmó i del càncer colorectal, superant les 5000 morts anuals. Segons dades del Centro Nacional de Epidemiología, a l'any 2002 el CaP fou responsable de 5664 defuncions, amb una taxa crua de mortalitat de 29.31 per cada 100000 habitants i una taxa ajustada (població estàndard europea) de 21.48 casos per 100000 habitants. El major impacte del CaP es dona en el subgrup de població amb menor expectativa de vida, de manera que el 90% de casos es diagnostica en homes majors de 65 anys. Si revisem la tendència de la mortalitat per CaP a Espanya entre els anys 1952 i 1996, podem observar que l'evolució de les taxes de mortalitat per CaP van ser ascendents

(increment pròxim a l'1% anual), mentre que l'evolució de la mortalitat per CaP va disminuir cada any si restringim l'anàlisi al període 1982-1996 [2].

A nivell de la Unió Europea, el CaP ocupa el segon lloc en quant a incidència de tumors malignes, si bé les diferències entre països és gran. A Europa es diagnostiquen cada any 2.6 milions de nous casos de càncer [3]. El CaP representa l'11% del total de càncers en els homes europeus, i és el responsable del 9% de les morts per càncer en els homes de la Unió Europea [4]. És important destacar que existeixen grans diferències regionals. Així a països com França, Suècia i Alemanya, aquesta neoplàsia ja representa el tumor més freqüent en homes.

Parkin et al. van publicar l'any 2001 un estudi d'incidència, prevalença i mortalitat secundària a càncer a nivell mundial on s'objectiva que el CaP era en aquell moment la neoplàsia més freqüentment diagnosticada en homes, amb més de mig milió de nous casos diagnosticats anualment [5].

El desenvolupament de la determinació de l'antigen específic prostàtic (PSA) en sèrum i la seva àmplia utilització en la pràctica urològica diària conjuntament amb una major conscienciació per part dels homes majors de 50 anys d'anar a l'uròleg amb regularitat, ha motivat un l'augment en la incidència de CaP que hem experimentat en els últims anys. L'àmplia utilització de la determinació de PSA també ha motivat que el diagnòstic de CaP es realitzi en fases més precoces de la malaltia, augmentant d'aquesta manera els casos amb malaltia localitzada i disminuint el número de casos amb malaltia metastàtica en el moment del diagnòstic. En estudis recents, la majoria de malalts (fins a un 70-80%) presenten en el moment del diagnòstic del CaP un estadi T1-2 N0 M0 [6-10]. L'ús del PSA també ha comportat que



puguem diagnosticar més precoçment aquells malalts que presenten progressió de la malaltia després d'haver estat sotmesos a tractament radical inicial (cirurgia versus radioteràpia).

Per conèixer la supervivència dels pacients amb càncer a Europa, es van desenvolupar els projectes EUROCORE-1, 2 i 3 que van suposar el seguiment de tots els casos inclosos en els registres poblacionals de càncer dels països europeus participants, informant de la supervivència global dels pacients oncològics. A l'estudi EUROCORE-3 es va analitzar la supervivència de 1815584 malalts adults diagnosticats de càncer entre els anys 1990 i 1994 a 24 països europeus. Espanya va aportar 3635 pacients dels registres poblacionals del País Basc, Navarra, Tarragona, Mallorca, Múrcia i Granada. Segons aquest estudi, la supervivència dels malalts diagnosticats de CaP a Espanya és del 86% a l'any del diagnòstic, i del 65.5% als 5 anys [11]. La supervivència ha millorat si la comparem amb les dades de l'estudi EUROCORE-2, que mostrava una supervivència pels malalts diagnosticats de CaP a Espanya entre els anys 1985-1989 del 83% a l'any del diagnòstic i del 54% als 5 anys [12].

La supervivència dels pacients amb CaP a Espanya és comparable a la d'altres països del nostre entorn. L'estudi EUROCORE-3 mostra una supervivència mitja a Europa del 87.8% a l'any del diagnòstic i del 65.4% als 5 anys [11].

Tot i les millores que hem experimentat tant pel que fa al diagnòstic com al tractament del CaP, s'estima globalment que la taxa de supervivència a 5 anys en el moment del diagnòstic és del 50%, reduint-se al 30% en aquells malalts amb malaltia metastàtica en el moment del diagnòstic [9, 13].

D'altra banda, el temps d'aparició clínica de metàstasis en aquells malalts que presenten progressió bioquímica després de cirurgia radical és de 8 anys, i el temps de progressió des de l'aparició de les metàstasis fins a la mort és de 5 anys [14].

Hem de tenir en compte que malgrat els avenços aconseguits en els últims anys en el diagnòstic precoç del CaP, un 20-30% dels malalts amb CaP presenten malaltia localment avançada o metastàtica en el moment del diagnòstic, essent en aquests casos nul·les les possibilitats de curació [15].

## **2. DIAGNÒSTIC DEL CÀNCER DE PRÒSTATA**

Actualment, les principals armes que disposem per a realitzar el diagnòstic de CaP són el tacte rectal, la determinació de les concentracions de PSA sèric i l'ecografia transrectal [16]. El diagnòstic de CaP es realitza quan es comprova la presència de cèl·lules neoplàsiques malignes d'adenocarcinoma en els espècimens quirúrgics, en els cores de les biòpsies prostàtiques o bé en les citologies per aspiració amb agulla fina. Tanmateix, l'examen anatomopatològic ens permetrà a més poder classificar el tumor segons la seva gradació o score de Gleason. Avui en dia la realització de múltiples biòpsies prostàtiques transrectals sistemàtiques guiades per ecografia és el mètode d'elecció per arribar al diagnòstic de CaP, ja que aquest mètode diagnòstic detecta més casos de càncer que no pas les biòpsies prostàtiques dirigides digitalment o guiades per ecografia sobre àrees sospitoses [17, 18].

### **2.1. Tacte rectal**

La majoria de CaP estan localitzats a la zona perifèrica de la glàndula, podent ser detectats mitjançant un tacte rectal quan el seu volum és igual o superior a 0.2 ml. La probabilitat que un tacte rectal anormal sigui altament suggestiu de CaP depèn de forma important del valor de PSA [19-21] (Taula 1).

PSA (ng/ml)	VPP per CaP
0-1	2.8-5%
1-2.5	10.5-14%
2.5-4	22-30%
4-10	41%
>10	69%

---

**Taula 1.** Valor de PSA i risc de càncer de pròstata. Extret de Catalona et al. 1994.

---

## 2.2. Antigen específic prostàtic (PSA)

La determinació i la mesura dels nivells sèrics de PSA a principis dels 80 va ha revolucionat el diagnòstic del CaP [22]. El PSA és una proteasa sèrica codificada per un gen de la família de les calicreïnes. És fabricat de forma pràcticament exclusiva per les cèl·lules epitelials de la pròstata. Des d'un punt de vista pràctic, és òrgano-específic però no càncer-específic, de manera que els seus nivells sèrics es poden trobar elevats en casos d'hipertròfia benigna de pròstata, en casos de prostatitis i en d'altres condicions de no-malignitat. Com a variable independent, el nivell de PSA és millor predictora de càncer que no pas una troballa sospitosa en un tacte rectal o en una ecografia prostàtica transrectal [21].

Actualment disposem de diversos kits comercials per mesurar el PSA, de manera que no existeix un test estàndard acceptat internacionalment. D'altres marcadors tumorals com la fosfatassa àcida prostàtica [23], no ens ofereixen informació addicional per al diagnòstic del CaP quan es determinen de forma conjunta amb el PSA [24]. Tampoc s'ha definit encara quin és el valor de PSA a partir del qual el malalt és considerat d'alt risc per patir un CaP [25]. El risc acumulat després de 7 anys de ser diagnosticat d'un CaP en un programa d'screening que es basava només en la determinació dels nivells de PSA, fou del 34% en aquells homes amb valors de PSA entre 3 i 6 ng/ml, del 44% en aquells amb valors que oscil·laven entre 6 i 10 ng/ml, i del 71% en aquells que presentaven valors de PSA superiors a 10 ng/ml [26].

La detecció del CaP no palpable depèn dels nivells sèrics de PSA. No existeix un valor de tall universalment acceptat pels valors de PSA, tot i que el valor superior a 4 ng/ml s'ha utilitzat en molts estudis. En homes amb edats compreses entre 50 i 66 anys, la taxa de detecció de CaP va ser del 13.2% en l'interval de PSA entre 3 i 4 ng/ml, essent considerats la majoria d'aquests casos de càncer com a clínicament significatius [27]. Inclús alguns autors han proposat punts de tall més baixos de PSA obtenint una taxa de detecció de càncer relativament alta [28]. La possibilitat de que molts malalts puguin amagar un CaP malgrat presentar uns nivells baixos de PSA ha estat recalçada pels resultats recents d'un estudi de prevenció dut a terme als Estats Units [29]. La taxa de CaP en relació als nivells de PSA corresponents a 2950 homes en el braç placebo i amb valors de PSA normals es presenta a la taula 2. L'edat en el moment de la biòpsia prostàtica variava entre els 62 i els 91 anys.

PSA (ng/ml)	Risc de CaP
0-0.5	6.6%
0.6-1	10.1%
1-1.2	17%
2.1-3	23.9%
3.1-4	26.9%

---

**Taula 2.** Risc de càncer de pròstata en relació a valors baixos de PSA. Extret de Thompson et al. 2004.

---

Les troballes d'aquest treball plantegen una situació interessant: si disminuïm el punt de tall de PSA, veurem augmentat el diagnòstic de càncers insignificants, la història natural dels quals probablement no impactaria en la supervivència global del pacient amenaçaria mai la vida del pacient [30].

Desgraciadament, encara no disposem de dades prou madures per poder recomanar un valor de PSA òptim que ens ajudi a detectar aquells càncers no palpables però clínicament significatius. S'han descrit diverses modificacions o variacions dels valors de PSA amb la intenció de millorar l'especificitat del PSA en la detecció precoç del CaP: densitat de PSA [31], densitat de PSA de la zona de transició [32], formes moleculars de PSA [33-35], velocitat de PSA [36] i temps de doblatge de PSA [37]. Totes aquestes modificacions del PSA poden ajudar-nos a distingir entre CaP i patologia benigna prostàtica, especialment en aquells casos que presenten uns valors

de PSA entre 4 i 10 ng/ml. Tot i així no existeix cap consens sobre l'aplicació d'aquestes modificacions de PSA en la pràctica clínica diària.

### **2.3. Ecografia transrectal**

El CaP pot objectivar-se de moltes diverses maneres a l'ecografia transrectal. Tot i que les àrees hipoecogèniques perifèriques solen ser la imatge més freqüent, en moltes ocasions no s'observen [38]. S'ha de recalcar que en molts casos el CaP és isoecoïc, essent només detectable amb la pràctica de biòpsies prostàtiques d'una forma sistemàtica. El grup d'Ellis va publicar que el 37.6% dels càncers que diagnosticava el seu grup provenien de biòpsies preses de zones isoecoïques de la pròstata [18].

L'ecografia transrectal juga dos papers en el diagnòstic del CaP: ens ajuda a identificar lesions sospitoses de malignitat i ens ajuda a millorar la precisió de les biòpsies prostàtiques. Sembla que en poblacions seleccionades, l'ecografia transrectal té la capacitat de detectar un 50% més de pacients amb CaP que l'exploració física [39, 40]. Malgrat tot, com hem comentat anteriorment, l'aparença ecogràfica del CaP és variable, i només un petit nombre de càncers serien detectats en el cas que tant el tacte rectal com el PSA fossin normals [18, 40]. Per tant, el principal paper de l'escala de grisos que ens aporta l'ecografia transrectal es basa en dirigir les biòpsies de manera que puguem obtenir un mostreig sistemàtic de la glàndula.

## 2.4. Biòpsia prostàtica

Les biòpsies prostàtiques amb aspiració amb agulla fina dirigides digitalment ens permeten realitzar tant el diagnòstic com establir la gradació del tumor amb un mínim risc de complicacions [41]. No obstant, aquest mètode requereix disposar d'un anatomopatòleg experimentat per tal d'assegurar que els resultats siguin reproduïbles. Val a dir que aquest mètode diagnòstic mai ha tingut adeptes fora dels països escandinaus.

La biòpsia prostàtica transrectal ecodirigida amb agulles de 18G s'ha convertit en el mètode estàndard per obtenir material per a la revisió histològica. Duent a terme una profilaxis antibiòtica adequada, es poden obtenir múltiples mostres o cores amb un mínim risc de complicacions [42, 43].

En els últims anys s'han desenvolupat tècniques de biòpsia amb ecografia doppler i/o sonocontrastos intentant ressaltar les àrees prostàtiques sospitoses de presentar càncer. Tot i que amb aquestes tècniques s'aconsegueixen unes taxes de detecció de càncer similars a les aconseguïdes amb la pràctica de biòpsies sistemàtiques [44], la seva difusió és encara escassa.

Estudis inicials mostraven que les taxes de detecció de càncer disminuïen si es reduïa el nombre de cores obtinguts. Només aquells pacients amb PSA superior a 10 ng/ml i amb malaltia palpable semblaven tenir una taxa de detecció adequada amb la pràctica de poques biòpsies dirigides a la zona de la lesió [45]. Per la resta de pacients es recomanava la pràctica de biòpsies més extenses obtenint un major nombre de cores. Les



biòpsies per sextants descrites per Hodge s'utilitzaven en aquestes situacions [17]. Més recentment s'ha substituït l'obtenció de biòpsies per sextants per la pràctica de biòpsies sextants dirigides a la zona lateral de la glàndula amb l'objectiu d'optimitzar les taxes de detecció de CaP [46, 47]. Amb aquesta tècnica, els cores que s'obtenen inclouen biòpsies de la zona posterolateral de la zona perifèrica, que representa la localització on amb més freqüència es troba el CaP precoç.

Existeix controvèrsia al voltant del nombre de biòpsies que s'han de realitzar. Diversos estudis han analitzat la taxa de detecció de càncer augmentant el nombre de cores obtinguts en la primera biòpsia. Pràcticament tots aquests estudis han objectivat una major taxa de detecció de càncer quan es compara amb la tècnica estàndard per sextants descrita per Hodges. Eskew i els seus col·laboradors han demostrat que l'obtenció de 13 a 18 cores presos de cinc regions prostàtiques diferents augmentava en un 35% la taxa de detecció de CaP si es comparava amb la tècnica estàndard de biòpsies per sextants [48]. D'altres estudis han demostrat que la zona de transició de la pròstata no hauria de ser considerada com a zona a biopsiar en la primera tanda de biòpsies prostàtiques, donada la baixa freqüència (menor o igual al 2%) amb la que el CaP es localitza a aquest nivell [49, 50]. De fet la gran majoria de càncers es detecten a la zona lateral i mitja de la pròstata, àrees que solen ser biopsiades amb la tècnica de biòpsies sextants dirigides lateralment. Hem de considerar que tant el nombre de biòpsies com la zona d'on s'agafen tenen la mateixa importància a l'hora d'optimitzar la detecció del CaP.

Es recomana dur a terme una segona tanda de biòpsies quan la primera ha resultat negativa. S'ha informat d'una taxa de detecció de càncer del 10-35% a la segona tanda de biòpsies [51, 52]. En aquells casos en què a la biòpsia trobem la presència d'una neoplàsia intraepitelial prostàtica d'alt grau o d'una petita proliferació acinar atípica, s'havia considerat que el 50-100% d'aquestes pròstates amaguen un càncer concomitant, i per tant la re-biòpsia immediata era mandatòria [53, 54]. Tot i això, estudis més recents com el metanàlisi de Epstein JI, Herawi M (2006) demostren que la probabilitat de detectar un càncer en una rebiòpsia després d'haver obtingut PIN en una biòpsia prèvia és de 22 %. En 9 dels 12 estudis avaluats no s'objectivaren diferències significatives pel que fa a la troballa de CaP en la rebiòpsia després de patologia benigne o HGPIIN. La raó per aquest canvi ha estat suggerit com la milloria en l'extensió de les biòpsies; així doncs, allò que actualment es defineix com a HGPIIN és únicament això, un focus aïllat i no un focus proper a un CaP.

Les recomanacions actuals diuen que aquells casos que mostrin 1 o 2 cilindres a la biòpsia de HGPIIN no requereixen una rebiòpsia immediata en el primer any de seguiment en absència d'altres indicadors de càncer (Epstein JL et al). En cas de trobar ASAP el risc de CaP és alt i per tant, cal una rebiòpsia en els propers 3 a 6 mesos d'aquest diagnòstic (Kronz JD, et al (2001)

Amb tot i això, a dia d'avui no disposem d'un esquema de biòpsies que ens permeti ometre la necessitat de re-biopsiar en el cas de que es mantingui de forma persistent la indicació de fer-ho.

### 3. ESTADIFICACIÓ DEL CÀNCER DE PRÒSTATA

La valoració de l'extensió primària del CaP es realitza habitualment mitjançant la pràctica del tacte rectal, la mesura dels nivells sèrics de PSA, la pràctica d'una gammagrafia òssia, i en ocasions més especials es complementa amb la realització d'una tomografia computeritzada o una ressonància magnètica i amb la pràctica d'una radiografia de tòrax.

La pràctica d'una estadificació minuciosa és imprescindible en el CaP per tal d'oferir la màxima informació al pacient sobre l'extensió de la seva malaltia, així com per poder escollir en cada cas quin serà el millor tractament que podem oferir als nostres malalts. S'han descrit diversos sistemes d'estadificació pel CaP, essent els més freqüentment utilitzats el de Jewett-Whitmore i el sistema TNM. La majoria d'experts utilitza la classificació TNM del 2002 [55]. En l'actualització del 2002, els casos amb malaltia no palpable detectats per augment del PSA es classifiquen com a T1c, mentre que les lesions T2 (lesions palpables però confinades a la pròstata) s'han subdividit en T2a, T2b i T2c com a la classificació del 1992 (Taula 3).

TNM 1992	TNM 2002	Whitmore-Jewett	Definicions
T1	T1	A	Tumor no palpable, clínicament inaparent, no visible per imatge, troballa histològica incidental.
T1a	T1a	A1	<5% de teixit ressecat <3 xips Troballa histològica incidental

T1b	T1b	A2	>5% de teixit ressecat >3 xips
T1c	T1c		Tumor identificat per biòpsia prostàtica (per elevació de PSA)
T2	T2	B	Tumor confinat a la pròstata
T2a	T2a	B1N B1	Tumor ocupa la meitat d'un lòbul o menys Nòdul palpable <2 cm i confinat a un lòbul  Nòdul palpable <2 cm i confinat a un lòbul
T2b	T2b	B2	Tumor ocupa mes de la meitat d'un lòbul però menys que ambdós lòbuls
T2c	T2c	B3	Tumor ocupa ambdós lòbuls
T3	T3	C	Tumor s'estén a través de la capsula prostàtica
T3a	T3a		Extensió extracapsular unilateral

T3b	T3a		Extensió extracapsular bilateral
T3c	T3b	C1 C2	Tumor envaeix la vesícula seminal (s) <6 cm de tumor mes enllà de la capsula prostàtica >6 cm de tumor mes enllà de la capsula prostàtica
T4	T4		Tumor fixat a estructures adjacents que no son les vesícules seminals

---

**Taula 3.** Comparació de les classificacions TNM de 1992, 2002 i de Jewett-Whitmore. Extret de Greene et al. 2002.

---

### 3.1. Estadificació T

El primer aspecte que hem de valorar a l'hora d'estadificar el CaP és el seu estadi local, on la distinció entre la malaltia intracapsular (T1-T2) i extracapsular (T3-T4) té un impacte molt important a l'hora de prendre les decisions terapèutiques. La valoració que obtenim amb el tacte rectal sovint subestima l'extensió tumoral. En un estudi publicat als anys 80, la correlació positiva entre el tacte rectal i l'estadi patològic del tumor només s'observava en menys del 50% dels tumors [56]. Tot i això, generalment no es recomana

realitzar altres proves complementàries per conèixer l'estadificació local de la malaltia, excepte en aquells casos en que una estadificació local precisa pot influir de forma important en la decisió terapèutica, com per exemple en aquells pacients als que es planteja un tractament curatiu.

Els nivells sèrics de PSA augmenten a mesura que l'estadi avança. No obstant, quan mesurem el PSA en un individu concret sembla que té importants limitacions a l'hora de predir amb exactitud l'estadi patològic final. Donat que tant el teixit benigne com el maligne fabriquen PSA, no podem establir cap relació directe entre els nivells de PSA i l'estadificació clínica o patològica del tumor [57-59]. S'ha demostrat que la valoració conjunta dels nivells de PSA, de l'score Gleason de la biòpsia prostàtica i de l'estadi clínic T, és més útil a l'hora de predir l'estadi patològic final que no pas la valoració individual de cada paràmetre [60].

Existeix controvèrsia sobre la utilitat de les diferents formes moleculars del PSA a l'hora de predir l'estadi T. Tot i que la ratio PSA lliure/PSA total s'ha objectivat que pot ser d'utilitat en l'estadificació del CaP localitzat [61], d'altres treballs han obtingut resultats completament oposats. Necessitem que es duguin a terme estudis multicèntrics més importants abans de poder utilitzar individualment qualsevol forma de PSA per realitzar l'estadificació de la malaltia.

Com hem comentat en el capítol de diagnòstic del CaP, el mètode més àmpliament utilitzat per obtenir imatges de la pròstata és l'ecografia transrectal. No obstant només el 60% dels tumors són visibles a l'ecografia transrectal, i la resta no es detecten donada la seva ecogenicitat. Amb l'ecografia transrectal podem descobrir àrees d'extensió extracapsular no

sospitades, però no és una exploració que ens pugui determinar amb la suficient exactitud l'extensió del tumor, i per tant no es recomana la seva pràctica de forma rutinària. Al voltant del 60% dels tumors pT3 no es detecten preoperatòriament amb l'ecografia transrectal [62]. Els criteris d'extensió extracapsular utilitzats a l'ecografia transrectal són: la irregularitat, la discontinuïtat i la densitat del límit de l'eco. Els criteris d'invasió de la vesícula seminal es basen en l'ompliment per ones ecogràfiques de l'àrea de la base de la pròstata que en condicions normals s'afila i s'aprima fins a pràcticament desaparèixer. Com en totes les exploracions ecogràfiques, el reconeixement d'aquestes troballes són molt operador-depenents. Aquest fet implica que no puguem basar-nos en l'ecografia transrectal per diferenciar els tumors T2 dels T3 [63]. A més, dos estudis han observat que l'ecografia transrectal no mostra cap avantatge ni cap superioritat en comparació amb el tacte rectal a l'hora de predir la malaltia organo-confineda [64, 65].

Un altre aspecte important a tenir en compte a l'hora de dur a terme l'estadificació local del CaP és la valoració de l'afectació de les vesícules seminals. La invasió de les vesícules seminals és predictiva de recidiva local o de recidiva a distància. Hi ha qui ha recomanat biopsiar les vesícules seminals per tal de millorar l'estadificació preoperatòria [66]. De fet la majoria d'autors pensen que no s'haurien de biopsiar les vesícules seminals d'una forma primària, sinó reservar aquesta actuació per aquells pacients que tinguin un risc elevat d'invasió de les vesícules seminals, en els que un resultat positiu en aquesta biòpsia modificaria la decisió terapèutica. Val la pena mencionar que un resultat negatiu de la biòpsia de la vesícula seminal no descarta completament la presència d'invasió microscòpica de la mateixa.

De forma general, es considera que serien candidats a biòpsia de vesícula seminal aquells malalts amb un estadi clínic superior a l'estadi T2a i amb uns nivells de PSA sèric superiors a 10 ng/ml [67, 68].

Hem d'intentar millorar l'estadificació pre-terapèutica del CaP. Ens podrien ser útils els anàlisis més exhaustius i detallats de les biòpsies prostàtiques (nombre de biòpsies, grau i extensió dels focus de CaP, perforació capsular) mentre esperem que s'acabin de desenvolupar noves tècniques [69-71]. També ens podria ser d'utilitat correlacionar l'score Gleason de la biòpsia amb l'estadi patològic final, ja que aproximadament el 70% dels malalts tenen malaltia localitzada quan l'score Gleason de la biòpsia és menor o igual a 6 [72].

Amb el desenvolupament de la tomografia computeritzada i de la ressonància magnètica nuclear semblava que podríem millorar l'estadificació local del CaP. Avui en dia, es considera que cap de les dues tècniques és suficientment fiable per estadiar localment la malaltia, i per tant no es considera mandatari el seu ús en tots els casos amb aquest objectiu [73, 74]. L'estudi de la glàndula prostàtica amb ressonància magnètica nuclear sembla ser el mètode no invasiu més precís a l'hora d'identificar els casos amb malaltia localment avançada [75]. Malgrat això la seva utilització rutinària en l'estadificació pre-tractament del CaP segueix sent motiu de controvèrsia, i no tots els centres poden disposar d'aquesta tècnica. D'altra banda, la tomografia computeritzada és més útil en la planificació de dosi prèvia al tractament amb radioteràpia externa.



### 3.2. Estadificació N

La indicació de dur a terme l'estadificació N estaria només reservada per aquells pacients als quals es planteja un tractament amb intenció curativa. Valors elevats de PSA, estadis locals T2b-T3, escassa diferenciació cel·lular i invasió perineural són variables que s'han relacionat amb un risc augmentat de presentar malaltia limfàtica o ganglionar [60, 75, 76]. En el cas aïllat d'un pacient, els nivells de PSA per si sols han demostrat ser de poca utilitat a l'hora de predir l'afectació ganglionar.

Alguns nomogrames com ara les taules de Partin, poden ser utilitzats per definir un grup de pacients amb un risc baix (<10%) de presentar afectació ganglionar. Aquells malalts amb nivells de PSA menors de 20 ng/ml, estadis T2a o inferiors i amb un score Gleason igual o inferior a 6, poden estalviar-se l'estadificació N donada la baixa probabilitat de trobar en aquests casos afectació tumoral limfàtica [60].

La presència d'un Gleason 4 en les biòpsies per sextants també s'ha utilitzat per definir el risc de presentar afectació ganglionar. Si algun cilindre de la biòpsia presenta de forma predominant un Gleason 4 o si més de 3 cores presenten (encara que sigui en una petita quantitat) un Gleason 4, el risc de presentar malaltia ganglionar ascendeix al 20-45%. Per la resta de pacients, el risc és del 2.5%, reforçant aquest resultat el fet de que l'estadificació N no és necessari en alguns grups de pacients seleccionats [77].

La tècnica gold estàndard per realitzar l'estadificació N és la pràctica d'una limfadenectomia quirúrgica, ja sigui per via oberta o laparoscòpica.

Estudis recents en els que s'han dut a terme limfadenectomies extenses, han demostrat que la fossa obturatriu no és sempre la primera estació limfàtica afectada en els pacients amb CaP [78, 79]. Tant la tomografia computeritzada com la ressonància magnètica nuclear tenen una sensibilitat baixa (varia entre el 0% i el 70%) a l'hora de detectar afectació ganglionar, i per tant la seva utilitat es considera limitada [74]. Tot i així, podem augmentar l'eficàcia de la tomografia computeritzada si hi associem la biòpsia-aspiració amb agulla fina de les adenopaties augmentades de tamany [80]. Aquells pacients asimptomàtics als que hem diagnosticat recentment un CaP i que presenten uns nivells de PSA inferiors a 20 ng/ml, la probabilitat d'objectivar troballes sospitoses d'afectació ganglionar a la tomografia computeritzada és inferior a l'1% [81]. Per aquest motiu, i donat que l'especificitat de la tomografia computeritzada és alta (93-96%) reservarem la pràctica d'aquesta tècnica per aquells malalts amb un alt risc de presentar afectació ganglionar. De la mateixa manera, reservarem la realització de la limfadenectomia per aquells pacients que presentin un augment de tamany dels ganglis limfàtics a la tomografia computeritzada o que presentin una biòpsia-aspiració dels ganglis positiva [82]. No obstant, un anàlisi retrospectiu recentment publicat aconsella utilitzar amb cautela el tamany de les adenopaties com a variable relacionada amb l'existència d'afectació limfàtica [83].

En els últims anys s'ha investigat sobre l'ús de tècniques de medicina nuclear i de tomografia per emissió de positrons per tal de millorar el diagnòstic de l'afectació ganglionar. Ambdós mètodes continuen investigant-se, i a data d'avui no en podem recomanar el seu ús rutinari donades les escasses dades de què disposem [84, 85].

### 3.3. Estadificació M

El 85% dels pacients que moren de CaP presenten afectació metastàtica de l'esquelet axial [86], tot i això, actualment menys del 5% dels tumors prostàtics de nou diagnòstic presenten aquestes metàstasis. Tant la presència com l'extensió de la malaltia metastàtica òssia reflecteix el pronòstic per a cada individu en particular.

La detecció de nivells elevats de fosfatasa alcalina òssia sol indicar la presència de metàstasis òssies en el 70% dels pacients [87]. Podem millorar l'efectivitat clínica apropant-la al 98% quan realitzem la determinació conjunta dels nivells de fosfatasa alcalina òssia i de PSA [88]. En aquest estudi prospectiu, l'anàlisi de regressió logística va demostrar que únicament l'extensió de la malaltia metastàtica òssia influïa en els nivells sèrics de fosfatasa alcalina òssia i de PSA. En contrast amb els nivells de PSA, els nivells de fosfatasa alcalina òssia han demostrat la seva relació estadística amb l'extensió de l'afectació òssia metastàtica [89].

La detecció precoç de l'afectació òssia metastàtica ha de posar-nos alerta sobre les complicacions que la destrucció òssia pot ocasionar en aquests pacients. La gammagrafia òssia continua essent la tècnica més sensible per la detecció de metàstasis òssies, essent superior a l'avaluació clínica, a les radiografies òssies i a les determinacions de fosfatasa alcalina òssia [90, 91]. El millor radiofàrmac per dur a terme la gammagrafia òssia és el tecneci bifosfonat, ja que és el que presenta una millor ratio teixit tou-os [92]. Basant-se en les troballes de la gammagrafia òssia, Soloway ha descrit

un sistema semi-quantitatiu de gradació mitjançant el qual es pot correlacionar la supervivència del malalt amb l'extensió de la malaltia metastàtica òssia objectivada en la gammagrafia [93]. (Taula 4)

Estadi	Definició (tipus de metastasi òssia)	Supervivència global als 2 anys
<b>EOD 0</b>	Normal o malaltia benigne	
<b>EOD 1</b>	Metàstasis òssies: < 6 focus d'hipercaptació	94%
<b>EOD 2</b>	Metàstasis òssies: 6-20 focus d'hipercaptació	74%
<b>EOD 3</b>	Metàstasis òssies: >20 però < superscan	68%
<b>EOD 4</b>	Superscan (75% de costelles, vèrtebres i óssos de la cintura pèlvica tenen focus d'hipercaptació)	40%

---

**Taula 4.** Extensió de la malaltia òssia segons Soloway et al 1992

---

A part de l'os, el CaP pot metastatitzar a qualsevol òrgan. Tot i així els més freqüentment afectats són els ganglis limfàtics, el pulmó, el fetge, el cervell i la pell. L'examen físic, la pràctica d'una radiografia de tòrax, d'una ecografia, d'una tomografia computeritzada o inclús d'una ressonància magnètica nuclear ens poden ser d'utilitat, i estaria plenament justificada en aquells pacients en els quals qualssevol símptoma pugui suggerir l'afectació metastàtica d'algun teixit tou.

Necessitem que es desenvolupin nous marcadors sèrics vàlids i fiables per tal de millorar l'estadificació pre-tractament dels malalts amb CaP. De moment el nivell de PSA és el millor que tenim. Un nivell de PSA superior a

100 ng/ml fou considerat per si sol com l'indicador més important de malaltia metastàtica, amb un valor predictiu positiu del 100% [94]. Aquest fet ha implicat que hagi disminuït el nombre de pacients amb CaP recentment diagnosticat que requereixin de la realització d'una gammagrafia òssia. Només en rares i comptades ocasions s'han descrit casos de malalts amb nivells baixos de PSA que presentaven afectació òssia metastàtica. La correlació entre els nivells de PSA i les troballes de la gammagrafia òssia en malalts amb CaP recentment diagnosticat que encara no han iniciat tractament ha estat motiu d'estudi per d'altres autors [95-97]. Les troballes d'aquests estudis suggereixen que la pràctica d'una gammagrafia òssia seria innecessària en aquells malalts asimptomàtics amb tumors ben o moderadament ben diferenciats que presenten nivells de PSA inferiors a 20 ng/ml. Contràriament, en aquells pacients amb tumors mal diferenciats i amb malaltia localment avançada es recomana la realització d'una gammagrafia òssia independentment del valor de PSA sèric [98, 99].

#### **4. TRACTAMENT DEL CÀNCER DE PRÒSTATA LOCALITZAT I LOCALMENT AVANÇAT**

L'objectiu del tractament del CaP hauria d'estar orientat principalment a millorar la supervivència del malalt tenint en compte la qualitat de vida que aquest tindrà el temps que visqui, més que a millorar la supervivència del pacient a qualsevol preu [100].

L'elecció del tractament s'hauria de realitzar en base a l'expectativa de vida del malalt (edat, comorbiditat), característiques del tumor (estadi, score de Gleason, valor de PSA i resultat de les biòpsies prostàtiques), i efectivitat i efectes secundaris dels diversos tractaments en mans del metge que tractarà al malalt; tot això sense oblidar també les preferències i l'opinió de cada pacient.

Per tal d'ajudar-nos a escollir el tractament idoni per cada pacient considerat individualment, hem de ser capaços de poder valorar el risc del malalt: pot progressar i metastatitzar la malaltia en els següents anys? Quina probabilitat d'èxit tenim si tractem al pacient? Quins són els riscos i complicacions de cada tractament? Mentre que alguns tumors petits i ben diferenciats progressaran lentament amb el temps, molts tumors detectats clínicament poden créixer localment [101], metastatitzar [102] o eventualment provocar la mort del pacient [103].

Tenint en compte l'estadi clínic, el nivell de PSA sèric i l'score de Gleason de la biòpsia prostàtica, podem classificar als malalts en grups de risc (Taula 5). Podríem definir als malalts amb baix risc, com aquells que presenten > 80% de probabilitats d'estar lliures de recurrència de la malaltia

després del tractament, els de risc intermedi com aquells que presenten unes probabilitats entre el 50-80%, els d'alt risc amb unes probabilitats entre el 15-50% i els de molt alt risc amb unes probabilitats < 15% d'estar lliures de recurrència després del tractament.

Grup de risc	TNM	Gleason	PSA (ng/mL)	Troballes a la biòpsia
<b>Baix</b>	1a o 1c i -	2-5 i -	<10 i -	Unilateral <50%
<b>Intermedi</b>	Com Baix o 1b, 2a	Com Baix o 6, 3+4=7	Com Baix <10	Bilateral <50%
<b>Alt</b>	Com Intermedi o 2b, 3a, 3b	Com Intermedi o >4+3	Com Intermedi o >10	Com Intermedi o >50%, perineural, ductal
<b>Molt alt</b>	Com Alt, o 4	Com Alt o >8	Com Alt o >20	Com a Alt o invasió limfovascular, neuroendocrins

---

**Taula 5.** Estimació del risc de recurrència tumoral per càncer de pròstata clínicament localitzat i localment avançat.

---

#### 4.1. Prostatectomia radical

La prostatectomia radical és el tractament quirúrgic del CaP, i consisteix en l'extirpació de tota la glàndula compresa entre la uretra i la bufeta incloent l'exèresi de les vesícules seminals. La via d'abordatge sol ser retropúbica tot i que també es pot dur a terme la via d'abordatge perineal. La prostatectomia radical laparoscòpica ha anat guanyant adeptes en els últims anys, i avui en dia són molts els centres que la duen a terme [104, 105].

La prostatovesicuclectomia radical fou realitzada per primera vegada a principis del segle XX per Young, qui va utilitzar una via d'abordatge perineal. La via d'abordatge retropúbica fou descrita per Memmelaar i Millin anys després. Més recentment, Walsh i Donker a l'any 1982, van descriure l'anatomia del complex venós dorsal i dels feixos neurovasculars [106] millorant de forma ostensible tant el sagnat com les taxes d'impotència i d'incontinència postoperatòria dels malalts.

Avui en dia la prostatectomia radical és l'únic tractament pel CaP localitzat que ha demostrat en un estudi prospectiu i randomitzat, un benefici en la supervivència càncer-específica dels malalts si la comparem amb la conducta expectant o conservadora [107]. La millora de la tècnica quirúrgica i l'experiència dels cirurgians han millorat les taxes de curació i han disminuït les complicacions intraoperatòries i la morbiditat postoperatòria [108, 109].

En aquells pacients amb CaP localitzat i amb una esperança de vida superior als 10 anys, l'objectiu de la prostatectomia radical (sigui quin sigui l'abordatge) ha de ser l'eradicació de la malaltia. D'altra banda cada cop són més els qui pensen que no es pot instaurar un límit d'edat a partir del qual no



es pugui considerar al pacient com a tributari de ser sotmès a una prostatectomia radical [110]. No obstant hem de destacar que la comorbiditat de la cirurgia augmenta amb l'edat del pacient, i que això condiciona un descens de la probabilitat de morir per CaP localitzat en aquells homes majors de 70 anys [103].

#### 4.1.1 Càncer de pròstata estadi T1a-T1b

L'estadi T1a del CaP es defineix com la troballa incidental de càncer en menys del 5% del teixit ressecat (ja sigui mitjançant una resecció transuretral (RTU) de pròstata o mitjançant una adenomectomia retropúbica), mentre que l'estadi T1b es defineix com la troballa incidental de càncer en més del 5% del teixit ressecat o bé quan el tumor és pobrament diferenciat. Malgrat que el risc de progressió de la malaltia en aquells casos amb estadi T1a no tractats és del 5% als 5 anys, aquests tumors poden progressar en el 50% de casos als 10-13 anys [111]. Per tant, el risc de que la malaltia progressi, sobretot en aquells casos amb un score Gleason alt, és real en aquells pacients joves amb una expectativa de vida superior als 15 anys.

Contràriament, s'espera que la majoria de pacients amb estadi T1b presentin progressió de la malaltia als 5 anys, i per tant es sol oferir un tractament agressiu en aquests casos [111]. És per tant important diferenciar bé els casos amb estadi T1a dels T1b, aconsellant-se la pràctica sistemàtica de biòpsies prostàtiques en el romanent prostàtic als 3 mesos de la cirurgia. Aquells pacients amb estadi T1b amb una esperança de vida superior als 10 anys són candidats a prostatectomia radical. Aquesta, tot i així, pot esdevenir

difícil després d'una RTU de pròstata, situació en la qual sovint queda molt poc teixit prostàtic romanent [112]. En aquests casos, una bona alternativa terapèutica pot ser el tractament amb radioteràpia externa.

#### 4.1.2. Càncer de pròstata estadi T1c

Els malalts amb tumor clínicament no detectable que es diagnostiquen d'un CaP per biòpsia prostàtica arrel d'una elevació del PSA, s'han convertit en el grup més representatiu dins del global de malalts que es sotmeten avui en dia a una prostatectomia radical. En cada cas particular, és molt difícil diferenciar aquells casos clínicament insignificants d'aquells que poden amenaçar la vida del pacient. Hi ha molts estudis que recalquen el fet que els tumors detectats per augment de PSA són clínicament significatius, recomanant que siguin tractats, ja que fins a un 30% dels tumors T1c són en realitat tumors localment avançats [112]. El percentatge de tumors clínicament insignificants detectats per una elevació de PSA varia entre l'11% i el 16% [113, 114].

El principal problema com hem comentat anteriorment és com poder identificar en el moment de la biòpsia, aquells casos que no requeriran ser sotmesos a una prostatectomia radical una vegada objectivem que són clínicament insignificants en l'anàlisi histològic definitiu de la glàndula extirpada. Tant les troballes de la biòpsia amb agulla com la fracció de PSA lliure ens poden ajudar a identificar aquells casos amb malaltia clínicament insignificant [115]. Les taules de Partin, actualitzades l'any 2001, poden també ser-nos de molta utilitat a l'hora d'intentar determinar l'estadi patològic

final amb l'objectiu de seleccionar millor aquells malalts candidats a tractament quirúrgic [60]. Alguns autors han proposat incloure informació sobre les biòpsies com ara el nombre de cores o el percentatge de cores envaïts per tal de millorar aquesta predicció [116]. Quan només un o pocs cores presenten invasió tumoral i el percentatge d'invasió en un cilindre és limitat, la probabilitat de trobar un càncer clínicament insignificant és més alta, sobretot en aquells casos amb scores Gleason baixos [117]. Semblaria raonable proposar un seguiment d'aquells malalts els tumors dels quals pensem que són insignificants. Tot i així, generalment la majoria d'autors són partidaris de recomanar la pràctica d'una prostatectomia radical a aquells pacients amb estadi T1c, donat que la majoria d'aquests pacients presentaran tumors clínicament significants.

#### 4.1.3. Càncer de pròstata estadi T2

La prostatectomia radical és un dels tractaments estàndard recomanats per aquells pacients amb un CaP en estadi T2 i amb una esperança de vida superior als 10 anys. El pronòstic és excel·lent en aquells casos en què observem que la malaltia està confinada a la pròstata un cop realitzem l'examen anatomopatològic [118, 119]. Malgrat que la majoria de tumors pobrament diferenciats s'estenen més enllà de la pròstata, aquells pacients amb tumors d'alt grau però organoconfinats en l'examen anatomopatològic continuen tenint un bon pronòstic després de ser sotmesos a una prostatectomia radical [120].

Quan el tumor es palpa o s'objectiva en les proves d'imatge, i està clínicament confinat a la pròstata, podem esperar que es produeixi una progressió de la malaltia en un percentatge elevat dels pacients amb supervivències llargues. El temps mitjà de progressió per un tumor T2 no tractat s'estima que és de 6 a 10 anys. Aquells pacients amb malaltia en estadi T2a haurien de ser tractats amb prostatectomia radical, ja que el 35-55% d'ells presentaran progressió de la malaltia als 5 anys si no reben cap tractament. D'altra banda més del 70% dels pacients amb estadi T2b i T2c (malaltia encara confinada a la pròstata però afectant més de la meitat d'un lòbul o ambdós lòbuls) presentaran progressió de la malaltia als 5 anys si no es tracten [121]. Aquestes dades s'han confirmat mitjançant un estudi randomitzat en el que es comparava la prostatectomia radical amb la conducta expectant en una àmplia mostra de pacients. En aquest estudi, la majoria de pacients presentaven un estadi T2, i aquells que eren tractats amb prostatectomia radical presentaven una reducció important de la mortalitat càncer-específica en comparació amb el grup de malalts sotmesos a conducta expectant [107].

La prostatectomia radical es considera una opció terapèutica excel·lent per aquells pacients joves i sans amb CaP localitzat; si el tractament el duu a terme un cirurgià experimentat, la subseqüent qualitat de vida del malalt un cop intervingut hauríem d'esperar que fos òptima. Recentment hem conegut que aquells cirurgians que tenen més volum de cirurgies realitzades a les seves espatlles presenten menys índex de marges positius. Això implica que prestant una major atenció als detalls quirúrgics, i ajustant aquests últims a les característiques de cada tumor, podem disminuir l'índex de marges

positius i millorar el control del càncer amb la prostatectomia radical [122]. Tot i això, en pacients anyosos o amb comorbilitats associades, hem de considerar que el tractament amb radioteràpia externa podria ser una opció terapèutica igual de bona o millor que la prostatectomia radical [123].

#### 4.1.4. Càncer de pròstata estadi T3

L'estadi T3a es defineix com la perforació de la càpsula prostàtica per part del tumor, mentre que en l'estadi T3b el tumor envaeix les vesícules seminals. En un temps passat, fins al 40% de malalts que es diagnosticaven de CaP presentaven en el moment del diagnòstic malaltia localment avançada. Aquest percentatge ha disminuït en l'actualitat, però el maneig d'aquests pacients continua essent discutit. La prostatectomia radical sovint comporta una extirpació incompleta de la malaltia en aquests casos. Hem de tenir en compte que a diferència dels tumors organoconfinats, els tumors localment avançats solen comportar una major morbiditat i un risc substancialment elevat de recurrència local. En la majoria de pacients la malaltia progressarà de forma sistemàtica. S'ha qüestionat si aquells pacients amb estadi T3 haurien de ser candidats a cirurgia radical o no. Disposem de pocs estudis que parlin dels resultats de la prostatectomia radical en aquest grup de pacients [124-127].

El tractament quirúrgic en els casos d'estadi T3 té sovint resultats decebedors, bé perquè els malalts tenen un alt risc de presentar marges positius o bé per l'existència o aparició precoç de malaltia metastàtica ganglionar o a distància [128, 129]. Això ha comportat que el tractament

combinat amb radioteràpia i hormonoteràpia hagi guanyat adeptes en aquests casos. Malgrat tot però, no s'ha demostrat encara que aquesta combinació de tractament tingui uns resultats millors que la prostatectomia radical. Un estudi randomitzat que comparava el tractament amb radioteràpia amb o sense hormonoteràpia associada, va mostrar un clar avantatge a favor del tractament combinat, però no va mostrar superioritat respecte al tractament quirúrgic [130].

Davant l'absència d'assajos clínics randomitzats que comparin les diferents opcions terapèutiques en aquests pacients, només podem utilitzar la informació d'estudis uni o multicèntrics per tal de definir el paper de la prostatectomia radical en aquesta situació. La majoria d'estudis han demostrat que al voltant d'un 15% de tots els tumors en estadi T3 estaven sobreestadiats (cT3, pT2), mentre que tan sols un 8% estaven infraestadiats (cT3, pT4) [124]. Òbviament aquells pacients sobreestadiats presentaven bones evolucions clíniques, mentre que la majoria de pacients amb estadi pT3b presentaven progressió precoç de la malaltia.

Els casos amb estadi clínic T3, presenten una supervivència global lliure de progressió bioquímica del 20% als 5 anys. En aquests casos l'score Gleason té una influència importantíssima en la progressió [120], però hem de tenir en compte que no sempre existeix una correlació fiable entre l'score Gleason de la biòpsia i l'score Gleason de la peça quirúrgica. D'altra banda, la invasió de les vesícules seminals, l'afectació metastàtica ganglionar, els marges quirúrgics positius i els valors alts de PSA són factors pronòstics independents de supervivència lliure de progressió bioquímica. Alguns autors han demostrat que la indicació de prostatectomia radical en pacients amb

estadi T3 i amb valors de PSA inferiors a 10 ng/ml, pot aconseguir supervivències lliures de progressió bioquímica superiors al 60% als 5 anys [125].

La cirurgia s'ha de considerar doncs com una opció terapèutica per alguns pacients amb estadi T3. Es poden beneficiar del tractament quirúrgic aquells malalts sobreestadiats clínicament, així com també els malalts amb estadis T3a reals. El problema continua essent la selecció prèvia a la cirurgia d'aquells pacients sense malaltia limfàtica i sense invasió de les vesícules seminals. Alguns nomogrames que inclouen els valors de PSA, l'estadi clínic i l'score Gleason poden ser-nos útils a l'hora de predir l'estadi patològic de la malaltia [60]. També ens poden ajudar a seleccionar o rebutjar els candidats a cirurgia radical la troballa d'adenopaties anòmales en la tomografia computeritzada o l'estudi de les vesícules seminals amb ressonància magnètica nuclear, així com la pràctica de biòpsies específicament dirigides dels ganglis limfàtics o de les vesícules seminals [80].

La prostatectomia radical en els casos amb estadi T3, requereix una experiència quirúrgica suficient per tal de mantenir una morbiditat acceptable. L'experiència del cirurgià és fonamental per tal de garantir la mínima morbiditat operatòria i els millors resultats funcionals en aquests pacients.

#### 4.1.5. Càncer de pròstata amb afectació limfàtica

La indicació de la prostatectomia radical en tots els estadis anteriorment exposats es realitza donant per suposada l'absència d'afectació limfàtica. La majoria de malalts amb afectació ganglionar (N+) presentaran en

poc temps malaltia disseminada sistèmica. No obstant s'han descrit supervivències càncer-específiques del 80% als 10 anys en malalts tractats amb prostatectomia radical i hormonoteràpia de forma simultània [131]. S'han qüestionat aquests resultats, ja que amb la utilització exclusiva de tractament hormonal es podrien obtenir els mateixos resultats.

La majoria d'uròlegs són contraris a indicar la prostatectomia radical en malalts amb afectació limfàtica coneguda, i estan d'acord en aturar la cirurgia si la biòpsia per congelació d'un gangli mostra invasió tumoral. Hem de destacar no obstant que en ocasions l'estudi anatomopatològic que es duu a terme després de la cirurgia radical pot mostrar invasió microscòpica dels ganglis limfàtics. La incidència de progressió tumoral és menor en aquells malalts que presenten menys ganglis envaïts i en aquells que només presenten invasió ganglionar microscòpica.

Aquells malalts que presenten malaltia limfàtica en l'estudi anatomopatològic posterior a la cirurgia radical haurien de rebre tractament hormonal, tenint en compte la relació entre els beneficis i els efectes secundaris d'aquest tractament a llarg termini. Per aquest motiu s'ha proposat el seguiment d'aquests pacients amb PSA, i iniciar el tractament hormonal quan objectivem que aquest comença a elevar-se.

Recentment han sorgit estudis que recomanen ampliar la limfadenectomia a les àrees ilíaqües externes i internes així com a l'àrea dels ganglis presacres [78, 79]. Hem de tenir en compte que aquests estudis no s'han dut a terme d'una manera prospectiva ni randomitzada. Avui en dia es posa cada vegada més en dubte la utilitat de realitzar una limfadenectomia limitada amb objectius d'estadificació i sense cap benefici terapèutic.



## 4.2. Radioteràpia

En l'actualitat no disposem d'estudis que comparin la prostatectomia radical amb la radioteràpia externa o amb la braquiteràpia en els casos de CaP localitzat, per tant es segueix el consens establert l'any 1988 per l'Institut Nacional de Salut Americà [132] en el que s'estableix que el tractament amb radioteràpia ofereix els mateixos resultats de supervivència a llarg termini que la cirurgia, tenint en compte a més que el tractament amb radioteràpia ofereix una qualitat de vida com a mínim tant bona com l'oferta per la prostatectomia radical [133]. En els últims anys s'han desenvolupat noves tècniques de radioteràpia amb la intenció d'optimitzar la dosi rebuda pel teixit diana disminuint la radiació rebuda pels teixits veïns i per tant disminuint els efectes secundaris. Són molts els centres que en l'actualitat ja disposen de la radioteràpia conformada en 3 dimensions (3D-CRT), i alguns centres comencen també a disposar d'una forma millorada d'aquesta última que és la radioteràpia d'intensitat modulada (IMRT). D'aquesta manera, el tractament amb radioteràpia amb escalada de dosis i la possibilitat d'aconseguir corbes còncaues d'isodosi s'han convertit avui en dia en una realitat existent en molts centres.

### 4.2.1. Càncer de pròstata localitzat. Estadi T1-T2c N0 M0

Els pacients del grup de baix risc (estadi T1a-T2a, N0 M0, amb score de Gleason inferior o igual a 6 i amb valors de PSA inferiors a 10 ng/ml),

poden sotmetre's a radioteràpia externa rebent una dosi de 70-72 Gy, ja que el resultat és similar a l'obtingut amb escalada de dosis [134].

Diversos estudis han mostrat que l'escalada de dosis té un impacte significatiu sobre la supervivència als 5 anys sense recidiva bioquímica, especialment en els pacients classificats com a cT1c-T3, amb dosis que varien de 76 a 81 Gy [134-136]. Aquest és el motiu pel qual els pacients del grup de risc intermedi (estadi T2b o PSA entre 10-20 ng/ml, o amb score Gleason de 7) poden beneficiar-se de l'escalada de dosis, tal i com van mostrar dos estudis randomitzats. El MD Anderson Cancer Center va dur a terme un estudi randomitzat on es comparava la 3D-CRT a 78 Gy amb la radioteràpia convencional a 70 Gy en 305 pacients amb estadi T1-T3 amb valors de PSA pre-tractament superiors a 10 ng/ml (mitja de seguiment de 40 mesos). Es va objectivar un 75% d'evolució lliure de malaltia als 5 anys en el grup de pacients que van rebre 78 Gy, en comparació amb un 47% en el grup que va rebre 70 Gy ( $p=0.01$ ) [137]. Els resultats d'aquest estudi han estat confirmats per un altre treball que avaluava 393 pacients amb estadi T1b-T2b, el 75% dels quals presentava un score Gleason igual i inferior a 6 i un valor de PSA inferior a 15 ng/ml. Aquests pacients es van randomitzar a rebre una dosi inicial i única sobre la pròstata o bé a rebre escalada de dosis. Amb un seguiment de 4 anys, es va objectivar un descens significatiu de la recurrència bioquímica als 5 anys ( $p=0.00001$ ) a favor d'aquells pacients que havien rebut una dosi superior (79.2 Gy) versus aquells que havien rebut la dosi convencional de 70.2 Gy. A la pràctica clínica diària, no s'ha arribat a un acord sobre el nivell que s'ha d'assolir amb l'escalada de dosis si bé una dosi de 78 Gy és considerada com a vàlida per molts autors.

En el cas dels pacients del grup d'alt risc (estadi T2c o score Gleason major de 7 o valor de PSA superior a 20 ng/ml), sembla que el tractament amb radioteràpia externa millora la supervivència lliure de progressió bioquímica als 5 anys [137], tot i que es mostra insuficient per cobrir el risc de recidiva més enllà de l'àrea pèlvica. Diversos estudis intenten valorar el paper de l'escalada de dosis amb o sense tractament hormonal adjuvant en aquest casos:

- El MRC amb tractament hormonal neoadjuvant comparant la radioteràpia convencional amb 64 Gy amb la radioteràpia radical conformada a altes dosis (74 Gy).
- La "Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC) comparant la dosi de 70 amb la de 80 Gy sense tractament hormonal associat [138].
- La "European Organization for Research and Treatment of Cancer" [139] comparant la estratificació de dosis (70, 74 i 78 Gy) amb i sense tractament hormonal concomitant.

D'Amico va dur a terme un estudi prospectiu i randomitzat que va incloure 206 pacients amb valors de PSA superiors a 10 ng/ml (valor màxim 40 ng/ml), un score Gleason igual o superior a 7 o amb evidència radiològica d'extensió extraprostàtica. L'estudi va comparar l'ús de 3D-CRT sola o en combinació amb 6 mesos de tractament hormonal. Amb un seguiment de 4.5 anys, els pacients que s'havien randomitzat a rebre 3D-CRT i tractament hormonal mostraven un índex de supervivència significativament superior ( $p=0.04$ ), una menor mortalitat específica per CaP ( $p=0.02$ ) i un índex de

supervivència lliure de tractament hormonal de rescat superior ( $p=0.002$ ) [140].

#### 4.2.2. Tractament amb radioteràpia postoperatòria immediata en els tumors amb estadi patològic T3 N0 M0

L'extensió extracapsular s'associa amb un alt risc de recurrència local, que pot arribar a ser del 30% [141]. Anàlisis multifactorials han demostrat que les variables predictores de recidiva bioquímica són: el nivell de PSA, l'score Gleason de la peça quirúrgica i el fet de presentar marges positius [142]. Només un estudi prospectiu i randomitzat ha investigat el paper de la radioteràpia postoperatòria immediata; l'estudi 22911 de la EORTC va comparar en pacients amb estadi patològic T3 N0 després de prostatectomia radical retropúbica la radioteràpia postoperatòria immediata a dosis de 60 Gy amb la radioteràpia diferida fins a la recidiva local amb dosis de 70 Gy. La radioteràpia postoperatòria immediata fou ben tolerada, objectivant-se una milloria significativa de la supervivència clínica i biològica als 5 anys: 72.2% versus 51.8% [130, 143].

En pacients amb estadi T1-T2 N0 (o T3 amb determinats factors pronòstics) o amb estadi pT3 pN0 amb un alt risc de recidiva local després d'una prostatectomia radical degut a disrupció de la càpsula, a marges positius i/o a invasió de les vesícules seminals, i que presenten un PSA inferior a 0.1 ng/ml un mes després del tractament quirúrgic, hem de recomanar:

- Radioteràpia immediata un cop recuperada la funció miccional o urinària.
- O, monitorització clínica i biològica seguida de radioteràpia de rescat, quan el PSA assoleix valors superiors a 0.5 ng/ml [144]. En aquells casos que s'espera assolir el valor de PSA de 1.0 ng/ml, sembla ser que la possibilitat de control local de la malaltia és inferior [145].

#### 4.2.3. Tractament amb radioteràpia del càncer de pròstata localment avançat, estadi T3-T4 N0 M0, T1-T4 N1 M0

En els pacients amb CaP localment avançat, i especialment en aquells amb risc de malaltia limfàtica, el tractament amb radioteràpia aïllada ha mostrat resultats decebedors [146]. Per aquest motiu, i donada l'hormonodependència del CaP, el tractament amb supressió androgènica (SA) s'ha combinat amb la radioteràpia externa amb dos objectius:

- Reduir el risc de metàstasis a distància, “esterilitzant” de forma potencial les micrometàstasis ja presents en el moment del diagnòstic.
- Reduir el risc de recurrència local a través de la inducció d'apoptosi cel·lular (efecte combinat amb la radioteràpia) [147, 148].

Nombrosos estudis han analitzat la combinació de radioteràpia i tractament hormonal.

#### 4.2.4. Tractament hormonal neoadjuvant

L'estudi 86-10 de la RTOG, va incloure 471 malalts amb estadi T2-T4 N0-Nx M0. El tractament amb SA es va iniciar 2 mesos abans de la irradiació, i es va mantenir durant el tractament amb radioteràpia. També es va administrar en aquells casos de recidiva en el braç control de l'estudi. El tractament hormonal consistia en l'administració de Flutamida 250 mg, 3 cops al dia i Acetat de goserelina 3.6 mg subcutani, cada 4 setmanes. El volum diana pèlvic va rebre una dosi de 45 Gy, mentre que el volum diana prostàtic en va rebre 20-25 Gy. Als 8 anys de seguiment, els casos que havien rebut SA presentaven millor control local de la malaltia (42% versus 30%,  $p=0.016$ ), millor supervivència lliure de malaltia (33% versus 21%,  $p=0.004$ ) i millor supervivència lliure de recidiva bioquímica (PSA<1.5 ng/ml, 24% versus 10%,  $p<0.0001$ ). Els pacients que presentaven un score Gleason entre 2 i 6 mostraven també una major supervivència (70% versus 52%,  $p=0.015$ ) [149].

#### 4.2.5. Tractament hormonal concomitant i adjuvant

L'estudi 22863 de la EORTC va reclutar 415 malalts amb CaP en estadi T1-T4 N0 M0, i va comparar la radioteràpia amb SA adjuvant amb la radioteràpia aïllada. Es va permetre l'ús de SA en aquells casos amb recidiva

de la malaltia. Un 82% del pacients foren catalogats com a T3, un 10% com a T4 i el 89% com a N0 en el moment del diagnòstic. El tractament hormonal va consistir en Acetat de ciproterona 50 mg, 3 cops al dia durant 1 mes, començant el tractament 1 setmana abans d'iniciar la radioteràpia, i s'associava a Acetat de goserelina 3.6 mg, cada 4 setmanes durant 3 anys, administrant-se la primera injecció el dia que es començava el tractament amb radioteràpia.

El volum diana pèlvic va rebre 50 Gy, mentre que el volum diana prostàtic en va rebre 20 Gy. Amb un seguiment mig de 66 mesos, s'objectivava que el tractament combinat oferia millors resultats en concepte de supervivència (78% versus 62%,  $p=0.001$ ), i de supervivència lliure de recidiva clínica (78% versus 40%,  $p<0.001$ ) [130]. La incidència acumulada de recidiva locorregional als 5 anys era d'1.7% versus 16.4% en el braç que únicament rebia radioteràpia ( $p<0.0001$ ), mentre que la supervivència sense recidiva clínica o biològica (PSA nadir 1.5 ng/ml) fou del 81% en el braç de tractament combinat comparada amb un 43% en el braç de radioteràpia aïllada ( $p<0.001$ ).

#### 4.2.6. Tractament hormonal adjuvant

L'estudi 85-31 de la RTOG va reclutar 977 pacients amb estadi T3-T4 N0-N1 M0 o amb estadi pT3 després de prostatectomia radical. La SA es va iniciar a la última setmana del tractament amb radioteràpia i es va continuar fins a la recidiva (Grup I), o bé es va iniciar al diagnosticar la recidiva (Grup

II). El 15% dels pacients del grup I i el 29% dels pacients del grup II havien estat sotmesos a prostatectomia radical, mentre que el 14% dels pacients del grup I i el 26% del grup II eren pN1. Es va administrar com a tractament hormonal Acetat de goserelina 3.6 mg, cada 4 setmanes. La dosi d'irradiació a la pelvis fou de 45 Gy, mentre que es van administrar 20-25 Gy al llit prostàtic. Els pacients amb estadi pT3 van rebre 60-65 Gy. Amb una mitja de seguiment de 7.3 anys, el tractament amb SA adjuvant va mostrar una major supervivència global estadísticament significativa tant als 5 com als 10 anys; 76% versus 71 %, i 53% versus 38% respectivament. A més, 95 dels 173 malalts amb estadi pN1 que van rebre radioteràpia pèlvica associada a SA immediata, presentaven una millor supervivència lliure de recidiva bioquímica als 5 anys (PSA <1.5 ng/ml) que aquells pacients que van iniciar la SA més tard (p=0.0001) [150].

#### 4.2.7. Tractament hormonal neoadjuvant, concomitant i adjuvant

L'estudi 92-02 de la RTOG es va tancar al 1995 després de reclutar 1554 pacients. Els pacients que rebien tractament hormonal prolongat (abans, durant i fins a 2 anys després de la radioteràpia), mostraven millories significatives que els pacients que rebien la modalitat curta de tractament hormonal (2 mesos abans i durant la radioteràpia) en termes de control actuarial lliure de recidiva bioquímica, recidiva metastàtica a distància, control local i supervivència lliure de malaltia. Respecte a la supervivència global als 5 anys, la modalitat de tractament hormonal prolongat va mostrar millors



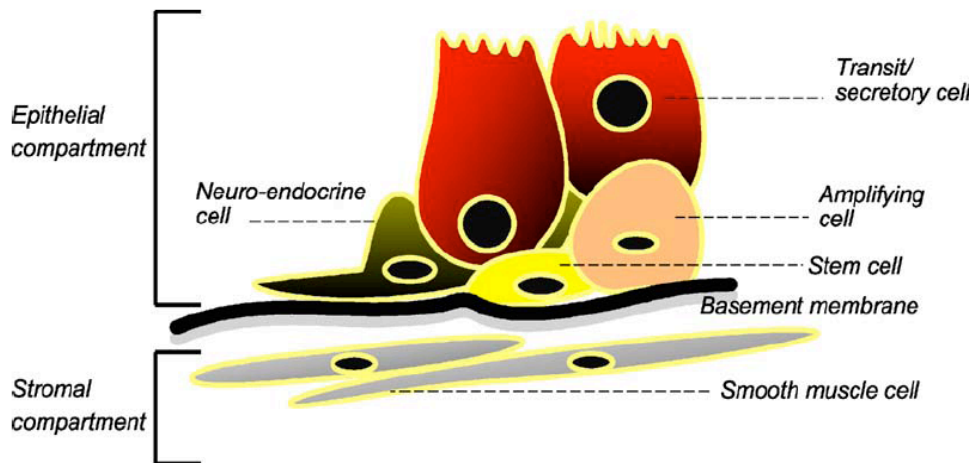
resultats que la curta només en aquells pacients amb tumors amb score Gleason entre 8 i 10 [151].

## **5. TRACTAMENT CÀNCER DE PRÒSTATA METASTÀTIC**

A l'any 1941, Huggins i Hodges varen publicar uns estudis que mostraven que el creixement i la supervivència de les cèl·lules prostàtiques estaven íntimament relacionats amb els nivells d'andrògens circulants [152]. Des de llavors i fins a l'actualitat, la supressió androgènica (SA) en les seves diferents formes ha estat el tractament sistèmic estàndard d'aquells pacients amb CaP localment avançat o metastàtic. En els últims anys, s'ha objectivat una tendència cap a l'augment de la utilització del tractament hormonal en pacients més joves i amb estadis menys avançats del CaP, així com en la recurrència de la malaltia després de tractament radical. En aquests casos el tractament hormonal s'ha utilitzat tant com a tractament únic, com formant part d'un tractament multimodal [153].

### **5.1. Biologia i morfologia cel·lular de les cèl·lules prostàtiques**

La glàndula prostàtica es caracteritza per presentar una organització complexa de diferents tipus cel·lulars, representats per un compartiment epitelial i un compartiment estromal, que estan separats per una membrana basal ben diferenciada (Figura 1).




---

**Figura 1.** La pròstata està formada per un compartiment estromal i un compartiment epitelial, separats per la membrana basal. Extret de Schalken 2005.

---

El compartiment epitelial de la pròstata està format per dos tipus cel·lulars: les cèl·lules epitelials basals i les cèl·lules epitelials glandulars (secretores) [154]. Les cèl·lules neuroendocrines, els macròfags no epitelials i els limfòcits intra-acinars es troben dispersos dins aquest compartiment.

Les cèl·lules glandulars secretores són les més nombroses dins el compartiment epitelial. Aquestes cèl·lules ben diferenciades, estan lligades a les cèl·lules epitelials basals i s'estenen cap al lumen acinar [154]. La funció principal d'aquestes cèl·lules exocrines és la secreció de fluid prostàtic que conté PSA, fosfatasa àcida prostàtica específica [23] i prostaglandines cap al lumen glandular. Les cèl·lules secretores tenen una capacitat proliferativa relativament limitada, però presenten un alt índex mitòtic [154]. El més important, és que aquestes cèl·lules expressen el receptor androgènic, i per

tant la seva viabilitat i la seva capacitat secretora són androgen dependents [155].

D'altra banda, seguim sense conèixer quina funció duen a terme les cèl·lules prostàtiques neuroendocrines. Sembla que podrien induir la proliferació de les cèl·lules veïnes mitjançant la secreció paracrina de neuropèptids com la cromogranina A [156]. Les cèl·lules neuroendocrines es caracteritzen generalment per l'absència de receptor androgènic i per la falta d'expressió de PSA. Donada la falta de receptor androgènic, les seves funcions reguladores no estan influenciades pels andrògens circulants i per tant són androgen-independents [157].

La principal funció de les cèl·lules epitelials basals és la síntesi i secreció dels components de la membrana basal. Aquestes cèl·lules no estan molt ben desenvolupades i rarament expressen receptor androgènic [158, 159]. La membrana basal de la pròstata conté un nombre escàs de cèl·lules mare poc diferenciades i cèl·lules Inter mitges entre les cèl·lules mare indiferenciades i les cèl·lules secretores i neuroendocrines ben diferenciades [154, 158, 159]. Les cèl·lules Inter mitges presenten un alt índex mitòtic i una moderada capacitat de renovar-se. Són androgen-independents per sobreviure, però depenen dels andrògens per créixer i expandir-se, i per tant són androgen-dependents. Per contra, les cèl·lules mare tenen una alta capacitat per renovar-se i un baix índex mitòtic, essent androgen-independents per la seva auto-renovació.

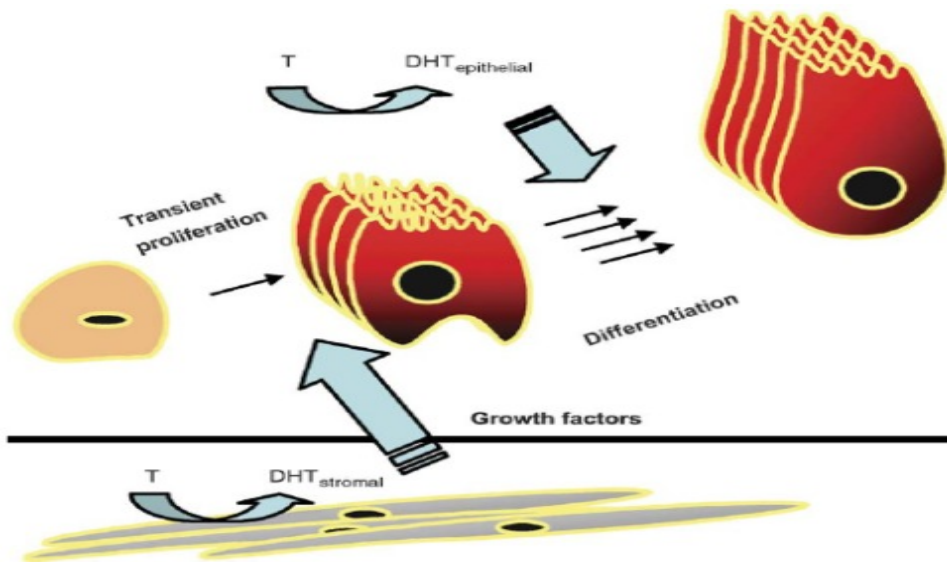
## **5.2. Efecte dels andrògens sobre el desenvolupament de les cèl·lules epitelials prostàtiques**

### 5.2.1. Regulació androgènica

El creixement de la glàndula prostàtica depèn, com la de qualssevol biologia cel·lular, de l'equilibri existent entre la proliferació cel·lular i la mort cel·lular (apoptosi). Si aquests dos components són equivalents, com sol passar en el teixit prostàtic normal, no existeix un creixement net prostàtic. En canvi, en el cas de que l'índex de proliferació cel·lular sigui major que el d'apoptosi, es produeix un creixement continu de la glàndula prostàtica i el nombre de cèl·lules augmenta. En el cas de la pròstata, aquest equilibri entre la proliferació cel·lular i l'apoptosi està regulat pel andrògens (Figura 2).

La testosterona, que és l'androgen circulant més important en sang perifèrica, és produïda principalment a nivell testicular. A nivell de la pròstata, la testosterona es converteix en 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT) mitjançant l'acció d'isoenzims 5-alfa-reductassa. Malgrat que ambdós andrògens són capaços d'unir-se al receptor androgènic, la DHT té una afinitat molt més alta pel receptor androgènic que la testosterona [160-162]. L'efecte directe de la testosterona sobre les cèl·lules epitelials prostàtiques, induïx diferenciació, mentre que l'efecte indirecte de la proliferació és mediat per la producció de factors de creixement per part de l'estroma prostàtic. Els andrògens també estimulen directament la producció de factor de creixement vascular endotelial (induint per tant l'angiogènesi) tant en el teixit prostàtic normal com

en el teixit prostàtic neoplàsic. A la pròstata normal, hi ha un equilibri òptim entre els diferents processos reguladors.



---

**Figura 2.** Tant la testosterona (T) com la dihidrotestosterona (DHT) produeixen un efecte directe sobre la diferenciació de les cèl·lules epitelials, i un efecte indirecte sobre la proliferació cel·lular a través de l'alliberament de factors de creixement per part de l'estroma prostàtic. Extret de Schalken 2005.

---

### 5.2.2. Castració i administració de testosterona

L'efecte de la testosterona en la cinètica cel·lular s'ha estudiat en rates castrades. Durant la primera setmana després de la castració,

aproximadament el 75% de totes les cèl·lules epitelials moren. La castració indueix a nivell de la pròstata l'apoptosi de les cèl·lules epitelials, mentre que pràcticament no existeix proliferació cel·lular.

La re administració de testosterona, inclús al cap d'un any de la castració, provoca una mínima apoptosi i un augment significatiu i important de la proliferació cel·lular [154]. La testosterona per tant, és la principal reguladora de la diferenciació, i condueix la morfogènesi epitelial de la pròstata aconseguint en pocs dies la repoblació cel·lular de tota la pròstata.

Quan un home és sotmès a un tractament de deprivació androgènica, els nivells de testosterona disminueixen en pocs dies fins a adquirir nivells que trobaríem en nens de 10 anys [155]. Ja que la supressió d'andrògens condueix a l'apoptosi de totes les cèl·lules androgen-dependents, totes les cèl·lules glandulars secretores patiran apoptosi. Conseqüentment, la pròstata involuciona ràpidament, degut a la pèrdua del compartiment epitelial prostàtic [155]. Ja que només les cèl·lules mare i les cèl·lules mare Inter mitges són androgen-independents per sobreviure, aquestes es mantenen vives durant la deprivació androgènica, augmentant en número. Tot i així, malgrat que les cèl·lules mare Inter mitges són androgen-independents per morir, són androgen-dependents per proliferar. Per tant, aquesta sensibilitat androgènica permet la restauració proliferativa del component cel·lular glandular androgen-depenent en el cas que es restauri la circulació i presència d'andrògens a nivell prostàtic [156, 158].

### 5.3. Tipus de supressió androgènica

El tractament estàndard dels pacients amb CaP localment avançat o metastàtic és la SA aconseguida mitjançant la castració quirúrgica practicant una orquiectomia bilateral, o bé química mitjançant l'ús d'agonistes LHRH associats o no a antiandrògens. Donat que clàssicament s'ha considerat a l'orquiectomia bilateral com el "gold standard" per assolir la SA, aquesta s'utilitza per a comparar-la amb d'altres o noves teràpies que busquen aconseguir la supressió d'andrògens.

S'ha demostrat àmpliament l'eficàcia comparable de la castració quirúrgica i de la teràpia amb agonistes LHRH. Diversos assajos clínics randomitzats [163-166] han comparat la seguretat i eficàcia de l'orquiectomia i dels agonistes LHRH. Tots aquests estudis mostren que ambdues formes de SA no presenten diferències a l'hora de valorar els índexs de resposta objectius i subjectius, així com tampoc objectiven diferències en els índexs de resposta de testosterona. Seidenfeld va dur a terme un metaanàlisi que va confirmar aquests resultats [167].

#### 5.3.1. Castració quirúrgica

Continua considerant-se com el "gold standard" de la SA, i representa el tipus de SA enfront a la qual es comparen la resta de modalitats de SA.

Consisteix en l'extirpació d'ambdues gònades masculines. És el tipus de SA que aconsegueix el descens més ràpid de les xifres de testosterona.



Té com a punt a favor el relatiu baix cost econòmic que comporta. Les seves principals complicacions són l'aparició de fogots, la pèrdua de la libido i la impotència. Aquests efectes secundaris són equiparables als que s'obtenen amb els agonistes LHRH, i són deguts a la supressió d'andrògens [153, 168, 169]. El fet que es tracti d'un tractament irreversible associat a l'impacte psicològic que suposa per als pacients, ha motivat que aquesta forma de SA hagi perdut força enfront de la reversibilitat que ofereix la SA amb agonistes LHRH [153, 169].

### 5.3.2. Estrògens

Els estrògens aconseguixen la SA mitjançant diversos mecanismes: supressió de la secreció de LHRH, inactivació dels andrògens, supressió directa de la funció de les cèl·lules de Leydig i citotoxicitat directa sobre l'epiteli prostàtic (aquesta última s'ha demostrat únicament in-vitro) [170]. Durant molts anys foren l'única alternativa existent a la castració quirúrgica com a via per aconseguir la SA. El dietilstilbestrol a dosi de 5 mg/dia proporcionava una bona resposta clínica, però l'elevat nombre de complicacions portaren a reconsiderar-ne la dosi (VACURG 1967). Estudis posteriors amb dosi de 1 mg/dia van mostrar una eficàcia similar amb una reducció dels efectes secundaris, tot i això un estudi EORTC mostra un descens dels nivells de testosterona només en el 80% dels pacients davant el 100% en els pacients castrats.

El seu ús per via oral, freqüentment induïa retenció de fluids, insuficiència cardíaca congestiva, trombosi venosa profunda, embolismes pulmonars, infart de miocardi i accidents vasculars cerebrals [171, 172]. Aquest ventall d'efectes secundaris amb una alta morbimortalitat associat a l'ús dels estrògens va motivar que es considerés a la castració quirúrgica com el "gold standard" en aquells pacients que requerien una supressió dels andrògens circulants.

En els últims anys, diversos grups han objectivat i defensat que els efectes secundaris induïts per l'ús d'estrògens es poden minimitzar si s'administren per via parenteral. Els efectes trombogènics dels estrògens administrats per via oral estan relacionats amb l'efecte de primer pas pel fetge amb la consegüent sobreproducció de factor VII. L'administració parenteral dels estrògens evita el primer pas hepàtic, disminuint els efectes secundaris cardiovasculars. Hedlund i Henriksson [173] van objectivar que l'administració parenteral de 240 mg de poliestradiol cada dues setmanes aconseguia una eficàcia i una seguretat cardiovascular comparable a la del bloqueig androgènic complert (BAC) en termes de supervivència global, i amb l'avantatge afegit de ser un tractament força més econòmic. D'altra banda Scherr [174] va objectivar que l'administració d'un mg diari de dietilestilbestrol aconseguia una supressió efectiva de les xifres de testosterona sense produir l'efecte nociu sobre la densitat mineral òssia que s'ha relacionat amb l'ús perllongat d'agonistes LHRH.

### 5.3.3. Agonistes LHRH

#### 5.3.3.1. Per què utilitzem agonistes LHRH?

L'hipotàlem secreta de forma pulsàtil LHRH, també anomenada hormona alliberadora de gonadotropina (GnRH). Aquest petit peptid té una vida mitja molt curta degut a la degradació a la que és sotmès per les peptidases, i de fet no necessita una vida mitja més llarga, ja que només ha de ser actiu durant un període curt de temps dins la circulació portal hipofisiària. A través d'aquesta circulació, la LHRH viatja a la hipòfisi anterior on s'uneix al seu receptor estimulando la síntesi d'hormona luteinizant (LH) i d'hormona fol·licle estimulant (FSH). La LH circulando en el torrent sanguini arriba a les cèl·lules intersticials de Leydig a nivell del testicle, on s'uneix amb el seu receptor activando-se mecanismes intracel·lulars que condueixen a la síntesi i alliberació de testosterona. Més del 90% d'aquesta testosterona circula en el torrent sanguini unida a la hormona sexual lligand de globulina (SHBG). Només un petit percentatge (aproximadament un 10%) viatja no unida a la SHBG, i per tant està disponible per produir activació a nivell cel·lular. Si els nivells de testosterona augmenten, ella mateixa mitjançant un efecte feed-back inhibeix l'alliberació de LHRH a nivell de l'hipotàlem així com l'alliberació de LH a nivell de la hipòfisi. Com a resultat d'aquest feed-back, disminueix la síntesi i alliberació de testosterona per part de les cèl·lules de Leydig [175-177].

La testosterona produïda per les cèl·lules de Leydig es transporta a través del sistema circulatori a d'altres òrgans, entre ells, la pròstata. A nivell de les cèl·lules prostàtiques, la testosterona és transformada en dihidrotestosterona (DHT) mitjançant la 5-alfa-reductasa. La DHT té una major afinitat que la testosterona pel receptor androgènic intracel·lular. Després d'unir-se la DHT amb el seu receptor androgènic a nivell del nucli, aquest complex s'uneix al seu corresponent promotor, resultant finalment la síntesi de PSA i de factors de creixement [175-177].

Les glàndules adrenals són la segona font d'andrògens (sintetitzen aproximadament el 5% del total d'andrògens) de l'organisme. L'hormona adrenocorticotropa (ACTH) estimula les glàndules adrenals per tal que produeixin androstenodiona i dehidroepiandrosterona. Ambdós andrògens son transformats en testosterona a nivell dels teixits perifèrics i de la glàndula prostàtica [175-178].

Quan s'administren per primera vegada, els agonistes LHRH indueixen un augment transitori de LH. Simultàniament es produeix un augment brusc de la concentració plasmàtica de testosterona per sobre dels nivells previs a iniciar el tractament ("flare phenomenon") [179]. Passades unes 3 o 4 setmanes es produeix una disminució de la regulació dels receptors LHRH a nivell de la hipòfisi reduint-se de forma concomitant els nivells de testosterona sèrica [179-182]. Hi ha dos factors importants que expliquen aquesta regulació a la baixa dels receptors LHRH: l'administració contínua d'agonistes LHRH comparat amb el model pulsàtil, i segon la sobre-estimulació dels receptors mantenint uns nivells sanguinis d'agonistes LHRH constantment per sobre de 100 pg/ml [183].

### 5.3.3.2. Agonistes LHRH i tipus

Els agonistes sintètics de LHRH d'alliberació prolongada han estat utilitzats en el tractament del CaP avançat durant més de 20 anys. Schally [184] va descobrir i descriure l'estructura de la GnRH l'any 1971. Des de llavors, s'han desenvolupat diversos agonistes LHRH: buserelina, goserelina, leuprolida i triptorelina, els quals s'han convertit actualment en la pedra angular del tractament del CaP avançat. Aquestes formulacions estan disponibles en diferents formes d'administració (subcutània i intramuscular) i gràcies a uns sistemes microcapsulars d'alliberació prolongada es poden administrar amb diferents cadències; des d'un a tres mesos, existint avui en dia formes implantables depot que permeten una administració més espaiada [185]. Cap estudi ha comparat directament els diferents agonistes LHRH, tot i així en una revisió sistemàtica [167] no es van observar diferències en les taxes de supervivència entre les diferents formules d'agonistes LHRH.

Els agonistes LHRH són efectius a l'hora de disminuir els nivells de testosterona sèrica [186, 187]. Després de 14-28 dies de la seva administració, els nivells de testosterona sèrica disminueixen per sota de 50 ng/ml [186, 188]. Hem de tenir en compte, però, que després d'iniciar el tractament el 33% dels pacients poden presentar elevacions transitòries dels nivells de testosterona coincidint amb la re-administració de l'agonista LHRH, podent comportar l'aparició de manifestacions agudes com dolor ossi, compressió medul·lar, urèmia, paràlisi o inclòs la mort en malalts amb malaltia metastàtica avançada [186]. Aquestes complicacions poden evitar-se amb l'administració prèvia durant uns dies d'un antiandrògen [189].

Els efectes secundaris descrits amb més freqüència inclouen fogots, disminució de la libido, impotència, astènia, ginecomastia i nàusees. La majoria d'aquests efectes secundaris són deguts a la supressió d'andrògens [190-194]. A més l'administració prolongada d'agonistes LHRH s'ha associat també amb l'aparició d'osteoporosi, recomanant-se en aquests pacients aturar l'hàbit tabàquic i el consum d'alcohol, així com realitzar exercici amb regularitat i prendre calci i vitamina D [195, 196].

#### 5.3.4. Antiandrògens

Els antiandrògens competeixen amb la testosterona i la DHT per la unió amb els seus receptors localitzats al nucli de les cèl·lules prostàtiques, induint apoptosi i inhibint el creixement del CaP [197].

Menys d'un 5% dels andrògens circulants provenen de les glàndules adrenals. El fet de bloquejar els receptors androgènics a nivell de la pròstata s'ha considerat com una hipòtesi per a millorar els efectes terapèutics aconseguits amb l'ablació gonadal [198].

Els antiandrògens es classifiquen en dos grups, els esteroïdals (acetat de ciproterona, acetat de megestrol i medroxiprogesterona) i els no esteroïdals (flutamida, nilutamida i bicalutamida). Tots dos tipus competeixen amb els andrògens per la unió amb el seu receptor, però mentre que aquest és l'únic mecanisme d'acció dels antiandrògens no esteroïdals, els esteroïdals tenen també propietats progestacionals que inhibeixen centralment la hipòfisi. Els antiandrògens no esteroïdals són els més

àmpliament acceptats i actualment són el mecanisme d'elecció per bloquejar els andrògens adrenals. De fet els antiandrògens no esteroïdals són preferits ja que quan s'usen en règim de monoteràpia no produeixen una disminució dels nivells de testosterona i per tant no solen disminuir la libido, causar impotència, ni solen produir alteracions de la densitat mineral òssia [199, 200].

Els antiandrògens s'han utilitzat com a monoteràpia en pacients que no havien rebut mai tractament hormonal amb la intenció de mantenir la potència sexual. Sembla clar que el seu ús en monoteràpia no es recomana en aquells pacients amb malaltia metastàtica o localment avançada, ja que la supervivència en aquest grup de malalts és menor que quan s'utilitza una SA testicular [201]. Tot i això la monoteràpia amb altes dosis d'antiandrògens ha estat i continua essent fruit d'investigacions. Anàlisis precoços d'alguns estudis que estan avui en dia en marxa, han mostrat una reducció en la progressió de la malaltia en pacients amb malaltia precoç no metastàtica [202, 203]. Malgrat aquestes dades prometedores, encara no disposem de dades sobre la supervivència global.

També s'han utilitzat els antiandrògens de forma combinada amb agonistes LHRH amb la intenció d'evitar l'aparició de símptomes ocasionats per l'augment de les xifres de testosterona que provoquen les primeres administracions d'aquests fàrmacs, o bé amb la intenció d'aconseguir un bloqueig "complet" de l'acció androgènica inhibint els andrògens adrenals que poden ser convertits en dihidrotestosterona.

Els efectes secundaris que manifesten els pacients amb més freqüència són la ginecomàstia, cansament, elevacions sèriques de les xifres

de transaminases i problemes gastrointestinals. Aquests últims solen ser els responsables de que es discontinuï l'administració d'antiandrògens [204, 205].

#### **5.4. Bloqueig androgènic complet versus agonistes LHRH**

El bloqueig androgènic complet (BAC) consisteix en utilitzar dues formes de SA. La primera radica en la inhibició de la producció de testosterona (mitjançant la castració quirúrgica o un agonista LHRH), mentre que la segona té la finalitat de bloquejar el receptor androgènic mitjançant l'ús d'un antiandrògen amb la intenció d'inhibir els efectes dels andrògens adrenals o produïts localment [168, 185, 206, 207].

Inicialment, els estudis que avaluaven el BAC van obtenir bons resultats. Labrie [208] va objectivar que el BAC amb un agonista LHRH i amb flutamida augmentava el percentatge i la duració de les respostes quan es comparava amb un grup històric de malalts control. En un altre treball publicat per Crawford [209] també s'objectivava un augment de la supervivència de 7 mesos en aquells malalts que rebien BAC.

Estudis més recents no han pogut confirmar que el BAC reporti major benefici que l'ús d'agonistes LHRH sols. El "Prostate Cancer Trialists Collaborative Group" (PCTCG) va publicar un metaanàlisi al 1995 [210] que contenia dades de 22 estudis randomitzats amb un total de 3283 morts en un grup de 5710 pacients amb CaP avançat. Els malalts tractats amb BAC mostraven una menor morbiditat i una major supervivència als 5 anys, però



aquestes diferències no adquirien significació estadística. El mateix grup va publicar 5 anys més tard una actualització del seguiment, incloent 5 estudis nous i més pacients (un total de 8275) per tal d'augmentar la potència estadística [211]. En aquesta ocasió s'objectivava una major supervivència als 5 anys en els malalts tractats amb BAC que era estadísticament significativa (25.4% versus 23.6%) però que tenia poca significació en la pràctica clínica. Samson [212] ha publicat més recentment un altre metaanàlisi que inclou 21 estudis i 6871 pacients, on es compara la SA sola amb el BAC. Aquesta revisió va objectivar un augment significatiu de la supervivència global als 5 anys en el grup de pacients tractats amb BAC. Els resultats d'aquest metaanàlisi foren criticats ja que només 10 dels 21 estudis i un 66% dels pacients mostraven un seguiment a 5 anys. A més tampoc es feia referència als efectes secundaris dels dos tipus de SA analitzats en aquest treball.

L'any 2004, la "Cochrane Collaboration" va revisar el BAC en el CaP avançat [213]. El fet de realitzar la SA amb BAC comportava una millor supervivència lliure de progressió a 1 any de seguiment, mentre que la supervivència lliure de malaltia només es veia millorada als 5 anys. La supervivència global també era significativament millor als 5 anys, però el fet de rebre BAC s'associava amb una major presentació d'efectes secundaris que motivaven que un 10% dels pacients deixés el tractament en comparació amb el 4% dels malalts que rebien únicament agonistes LHRH.

Podem concloure analitzant aquestes dades, que el BAC sembla tenir un modest benefici respecte als agonistes LHRH en quant a augmentar la supervivència dels pacients. La freqüència amb què es presenten efectes

secundaris i el major cost econòmic del BAC inviten a preguntar si aquesta forma de SA s'ha d'estendre a tots els pacients que la necessitin o bé si el seu ús s'ha de restringir només per a una petita proporció de pacients amb CaP avançat.

### **5.5. Quan hem d'iniciar el tractament amb supressió androgènica ?**

El tractament amb SA és considerat el tractament estàndard per aquells pacients amb CaP metastàtic androgen-depenent. D'altra banda, no s'ha establert clarament quin és el millor moment per iniciar el tractament amb SA en aquells casos en què el CaP androgen-depenent es manifesta únicament com un ascens de PSA. S'han dut a terme tres estudis randomitzats que han comparat el tractament precoç i el tractament diferit amb SA, amb resultats contradictoris.

En el primer estudi, l'estudi VACURG 1, els pacients amb CaP avançat es van randomitzar en un grup que rebia tractament immediat amb orquiectomia bilateral més 5 mg diaris de dietilestilbestrol [214], un altre grup era sotmès a orquiectomia bilateral més un placebo, un tercer grup rebia únicament 5 mg de DES diaris, i el quart grup rebia placebo amb la possibilitat de creuar-se amb altres grups en aquest últim cas quan es demostrava progressió de la malaltia [171, 215]. No es va demostrar cap diferència ni millora de la supervivència en cap dels grups de tractament, concloent-se que el tractament precoç amb SA no era superior que el tractament diferit amb SA.

En un segon estudi, el Medical Research Council va dur a terme un anàlisi randomitzant 934 malalts amb CaP (434 amb malaltia metastàtica i 500 sense) en dos grups, un que rebia de forma immediata tractament amb SA i un altre que rebia el tractament amb SA de forma diferida quan s'objectivava progressió de la malaltia [216]. Si agafem com a objectiu final de l'estudi la mort per CaP, no s'objectivaven diferències entre el grup de tractament precoç (65% de morts per CaP) i el grup de tractament diferit (69% de morts per CaP) en aquells pacients amb malaltia metastàtica manifesta. D'altra banda, en aquells pacients sense malaltia metastàtica coneguda, semblava que aquells que rebien la SA de forma immediata presentaven menys mort per CaP (32%) que el grup que rebia SA de forma diferida (49%). Recentment s'han publicat resultats d'aquest estudi amb un temps de seguiment més llarg sense detectar-se diferències estadísticament significatives entre el grup de malalts amb CaP que rebien SA immediata i diferida.

L'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) va dur a terme també un estudi prospectiu i randomitzat comparant la SA immediata amb l'actitud conservadora en un grup de 98 pacients que havien estat sotmesos a prostatectomia radical en els que es va trobar malaltia metastàtica ganglionar [217]. Amb un seguiment de 7.1 anys, es va demostrar una diferència significativa en quan a major supervivència en aquell grup de pacients que havien rebut tractament immediat amb SA.

Malauradament no coneixem el mecanisme que expliqui els resultats diferents d'aquests tres estudis que mostren un aparent benefici de la SA immediata sobre la diferida. Molts uròlegs influïts probablement per l'opinió

dels seus pacients, advoquen per iniciar el tractament amb SA tant bon punt s'objectiva la recurrència del CaP després d'haver sotmès al malalt a tractament radical, recurrència que es sol manifestar amb un ascens de PSA. El fet d'iniciar la SA en aquest moment pot explotar qualssevol benefici afegit atribuïble a l'inici immediat del tractament, però hem de tenir en compte que també augmentarà la possibilitat de que el pacient presenti efectes secundaris del tractament hormonal com pèrdua de massa òssia, pèrdua de libido, deteriorament cognitiu i empitjorament de la seva qualitat de vida. Si tenim en compte que la mitja de supervivència d'aquest pacients és superior als 16 anys, les conseqüències dels efectes adversos del tractament amb SA mereixen que hi prestem atenció [218]. Contràriament, si esperem a que la malaltia metastàtica estigui establerta i es manifesti clínicament per iniciar el tractament amb SA, podem perdre els avantatges del tractament immediat amb SA, però podem aconseguir un major temps lliure d'efectes secundaris. El temps de doblatge del PSA ens pot ajudar a estratificar els pacients amb elevacions de PSA, de manera que aquells malalts amb temps de doblatge de PSA curts requeriran tractament amb SA de forma més precoç que aquells amb temps de doblatge de PSA allargats [218].

## **5.6. Indicacions del tractament amb supressió androgènica**

Hem pogut objectivar les diferents opinions i la manca d'acord existent dins la comunitat urològica al voltant de diversos aspectes referents al

tractament amb SA. Tot i així, podem establir una sèrie d'indicacions del tractament hormonal:

- Malaltia metastàtica simptomàtica, amb la intenció de pal·liar els símptomes i de reduir el risc de que es presentin seqüeles catastròfiques de la malaltia avançada (compressió medul·lar, fractures patològiques, obstrucció ureteral, metàstasis extra-esquelètiques). (Nivell d'evidència: 3).
- Malaltia metastàtica asimptomàtica. L'ús de la SA de forma immediata per tal de diferir la progressió cap a un estat simptomàtic i per prevenir les complicacions serioses relacionades amb la progressió de la malaltia [216] (Nivell d'evidència: 1b).
- Malaltia metastàtica ganglionar. La SA immediata pot millorar la progressió lliure de malaltia i fins i tot la supervivència del malalt [217] (Nivell d'evidència: 1b) [219] (Nivell d'evidència: 3).
- Malaltia localment avançada no metastàtica. La SA immediata pot millorar la supervivència lliure de malaltia [216] (Nivell d'evidència: 1b).
- Malaltia localment avançada simptomàtica [129] (Nivell d'evidència: 4).
- Malaltia localment avançada asimptomàtica, en malalts que no poden sotmetre's a tractament radical local.

## 6. BIOLOGIA DE L'OS NORMAL

### 6.1. Formació d'os normal

L'os és un teixit dinàmic que està constantment remodelant-se al llarg de tota la vida. L'estructura de l'os compacte i esponjós proporciona la resistència i la densitat correctes per a una bona mobilitat. A més, l'os és un reservori de calci, magnesi, fòsfor, sodi i altres ions necessaris per a les funcions de l'homeòstasi. L'esquelet està molt vascularitzat i rep aproximadament el 10% de la despesa cardíaca.

Les propietats de l'os venen dels seus components extracel·lulars. La seva estructura consta d'una fase mineral sòlida íntimament unida a una matriu orgànica, formada en un 95% per col·lagen tipus I. La porció no col·làgena de la matriu orgànica conté proteïnes provinents del torrent sanguini (albúmina i glucoproteïnes a-HS), proteïnes amb àcid a-carboxiglutàmic, osteocalcina, osteonectina, ostopontina i tromboespondina. Algunes d'aquestes proteïnes poden funcionar iniciant la mineralització i promovent la unió de la fase mineral a la matriu.

La fase mineral està formada per calci i fosfats. La millor manera de definir-la és com una hidroxiapatita escassament cristal·lina, tot i que el quocient molar calci/fosfat sigui inferior al quocient molar de 1.67 propi de l'hidroxiapatita.[220]

A l'inici, la fase mineral de l'os es diposita íntimament unida a les fibretes de col·lagen i es localitza específicament en els "intersticis" que deixen entre si les fibretes de col·lagen. Aquesta disposició arquitectònica del mineral origina

un producte o material bifàsic adequat per a resistir les forces mecàniques. La formació i localització de la fase inorgànica està determinada en part per la matriu orgànica.

Els **osteoblasts** són les cèl·lules d'origen mesenquimatós que sintetitzen i secreten la matriu orgànica. En tots els ossos vius es dona cert grau d'activitat osteoblàstica (un 4% de totes les superfícies en un adult). La mineralització de la matriu per formar sobretot les *osteones* (sistemes de Havers) comença poc després de ésser secretada la matriu (mineralització primària) però no finalitza fins algunes setmanes després (mineralització secundària). Els osteoblasts es caracteritzen per:

- la seva localització i morfologia
- tenen una forma específica de fosfatasa alcalina
- disposen de receptors de PTH i 1,25-dihidroxivitamina D
- capacitat per sintetitzar les proteïnes específiques de la matriu (col·lagen tipus I, osteocalcina, osteopontina)

Quan un osteoblast secreta la matriu que posteriorment es mineralitzarà, la cèl·lula que rodeja d'aquesta matriu i acaba convertint-se en un **osteòcit** que segueix rebent el rec sanguini a través d'uns canalicles. Els osteòcits sintetitzen col·lagen tipus I i altres substàncies que formaran l'anomenada matriu extracel·lular de l'os que posteriorment es fortifica amb el dipòsit de sals de calci,

La resorció òssia la realitzen principalment els **osteoclasts**, cèl·lules multinucleades que es formen a partir de la fusió de cèl·lules hematopoètiques primitives relacionades amb la sèrie fagocítica mononuclear (fins a 50 nuclis s'arriben a fusionar) [221]. Es poden formar in vitro a partir

de moll d'os i cèl·lules de la melsa, un procés facilitat per la presència de vitamina D3 i cèl·lules de l'estroma [222]. El fet que una cèl·lula precursora s'acabi diferenciant en un osteoclast ve determinat per l'adquisició dels marcadors fenotípics de maduració com són el receptors per la calcitonina, TRAP (trapatase resistant acid phosphatase), integrina  $\alpha v\beta 3$ , la fusió de nuclis i la capacitat per formar llacunes a l'os [223]. Els osteoclasts habitualment només estan actius sobre un 1% de les superfícies òssies de l'adult. La resorció de l'os té lloc en espais festonejats (llacunes de Howship) on els osteoclasts estan units a través d'una integrina específica als components de la matriu òssia (osteopontina). Aquesta zona (zona clara) conté proteïnes contràctils. El pol·límer cel·lular amb capacitat resorptiva forma un vorell rugós especialitzat. El mineral i la matriu desapareixen d'aquest espai on el ribet rugós està plegat i en contacte amb l'os. Les proteïnes, fins i tot una ATPasa especialitzada en la bomba de protons, es troba en la membrana del ribet rugós fet que facilita que en el compartiment extracel·lular adjacent es generi un medi àcid que afavoreix la solubilització de la fase mineral.

La matriu òssia es reabsorbeix en el medi àcid annex al ribet rugós per acció d'hidrolases després de solubilitzar-se la fase mineral.

Hi ha varis lligands solubles que regulen la diferenciació d'osteoblasts i osteoclasts a partir de les cèl·lules precursors, com per exemple els factors estimulants de colònies i IL 6 i 11.

L'os es un magatzem de factors reguladors del creixement. Alguns dels factors que afecten la funció dels osteoblasts són: factor de creixement transformador ( $TGF\beta$  tipus I i II), factors de creixement fibroblàstic àcid



(aFGF) i bàsic (bFGF), factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGF) i els factors de creixement afins a la insulina (IGF I i II).

Els factors que actuen sobre els osteoclasts són: IL-1, factor de necrosi tumoral (TNF), interferó  $\gamma$ , factors estimulants de colònies (CSF). Alguns dels efectes sobre els osteoclasts estan mediatos per osteoblasts i fibroblasts adjacents a la medul·la òssia. Per exemple, els osteoclasts madurs no tenen receptors per la PTH, hormona que afavoreix la resorció òssia actuant en primer lloc sobre els osteoblasts i fibroblasts de l'estroma.

## **6.2. Remodelació òssia**

L'os té múltiples funcions en els vertebrats, com són la protecció d'òrgans vitals i del moll d'os, suport estructural als músculs, emmagatzematge i alliberament de ions (calci) i factors de creixement emmagatzemats a la matriu.

L'os en l'adult es renova constantment gràcies a múltiples estímuls en un procés anomenat remodelació òssia.

La remodelació òssia inclou la destrucció de trabècules òssies per part dels osteoclasts i tot seguit els osteoblasts reomplen els buits de matriu òssia. És un procés similar a l'ossificació endocondral però en aquest cas l'equilibri és màxim entre osteoclasts i osteoblasts (en l'ossificació endocondral es dona una major resorció per tal de permetre la formació de la cavitat medul·lar dels ossos).

Els processos que determinen la remodelació òssia encara no es coneixen en profunditat. Inclouen la lesió de parts toves canvis en les forces

mecàniques resultat de alteracions corporals, alliberament de citoquines i factors de creixement relacionats amb canvis en els nivells hormonals. Es tracta d'un procés estretament regulat on la formació va seguida de la destrucció d'os de manera que aproximadament en un adult podem trobar fins a un milió de microfocus de remodelació.

Estudis recents demostren que com a mínim en resposta a forces mecàniques (i probablement en resposta a d'altres factors), els osteòcits regulen la recaptació d'osteoclasts als llocs de resorció induint l'expressió de la molècula RANKL pels osteoblasts en el microambient de l'os [224]. Tot i això els mecanismes moleculars precisos que controlen l'inici, progressió i aturada de tot aquest procés són poc coneguts.

En principi els osteòcits es comuniquen entre ells i amb els osteoblasts en la superfície òssia i a la medulla òssia. Sembla ser que aquesta és la manera amb que els osteòcits regulen l'expressió RANKL pels osteoblasts.

La ratio de remodelatge ossi i el nombre de focus de remodelació s'incrementen en varietat de situacions com l'osteoporosi post menopàusica, hiperparatiroidisme, artritis reumatoïda, on s'alliberen citoquines proinflamatories que estimulen la resorció òssia [225].

La majoria d'aquests factors estimulen la resorció òssia principalment per un mecanisme indirecte que implica la sobreexpressió de M-CSF i RANKL pels osteoblasts i altres cèl·lules [226].

Els nostres coneixements sobre l'activitat dels osteoclasts han avançat ràpidament des de l'establiment del sistema de senyalització RANK/RANKL/OPG. De fet, ara tenim clar que els osteoclasts no són simplement cèl·lules que reabsorbeixen os sinó que també regulen el

funcionament dels osteoblasts [227, 228], l'alliberament de les cèl·lules hematopoètiques des de la medul·la òssia fins a la sang [229] i d'immunomodul·ladors en estat patològics [230].

### **6.3. Regulació de la formació i activació dels osteoclasts amb el sistema OPG/RANKL/RANK**

Els osteoclasts deriven de precursors mononuclears mieloides que també poden donar lloc a macròfags.

L'expressió de M-CSF pels osteoblasts es necessària perquè les cèl·lules progenitores es diferenciïn a osteoclasts, però a part calen altres factors com RANKL i RANK als osteoclasts. El primer en descriure-ho fou Yoshida H et al [231] que van observar en un model de ratolins sense M-CSF l'existència d'osteopetrosi degut a l'absència d'osteoclasts.

L'any 1981, Rodan i Martín van proposar que els osteoblasts devien intervenir en la regulació de la reabsorció òssia a través d'hormones calcitròfiques i altres factors de resorció com la PTHrp (Parathyroid hormone-related protein). La seva hipòtesis es basava en el fet que els osteoclasts no semblaven mostrar receptors per la PTH, PTHrp i altres hormones calcitròfiques, mentre que els osteoblasts sí que mostraven aquests receptors tan importants.

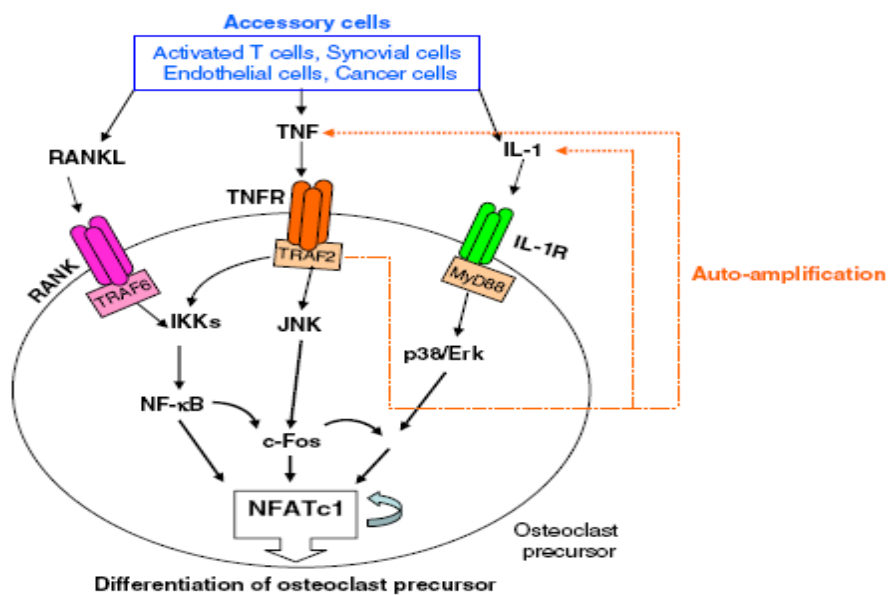
El descobriment que va resoldre l'enigma del mecanisme local de regulació òssia fou inesperat. Molts grups de recerca van intentar de forma poc exitosa de purificar el que finalment ha estat RANKL. De fet 4 grups

investigadors ho van descobrir de forma paral·lela per camins diferents. El grup Amgen de forma inesperada van descobrir l'inhibidor de RANKL, la Osteoprotegerina (OPG). Aquest grup pretenia dissenyar models de ratolins transgènics que sobre-expressessin varis receptors TNF cDNA per tal de trobar molècules que poguessin interferir en la via de transducció de senyal de TNF. Amb això van observar que els ratolins que expressaven un determinat cDNA desenvolupaven osteoporosi degut al dèficit d'osteoclasts [232]. Paral·lelament, Investigadors al Japó van descobrir una molècula idèntica purificant factor ST-2 de les cèl·lules osteoblàstiques que inhibia la formació d'osteoclasts. [233]. Ambdós grup utilitzaren la clonació de l'expressió i OPG com una prova i ràpidament van identificar el seu ligand, OPGL i el factor de diferenciació dels osteoclasts (ODF) [221, 223]. El ODF va resultar esser idèntic a un membre de la superfamília TNF que s'havia identificat feia menys d'un any i que s'havia anomenat receptor activador of nuclear factor-kB ligand (RANKL) i TNF-related activation induced cytokine (TRANCE) [234]. Investigadors a Immunex ja havien descobert RANK mentre seqüenciaven cDNA d'una biblioteca de cDNA de cèl·lules mieloides dendrítiques, de forma que aviat fou identificat com el receptor de OPGL/ODF. Així doncs, havien descobert que RANK es trobava implicat en la supervivència de les cèl·lules dendrítiques i aïllaren RANKL. De fet, trobaren que RANKL es trobava expressat per les cèl·lules T i que incrementava la supervivència i proliferació de les cèl·lules dendrítiques.

RANKL/RANK també són requeriments essencials pel desenvolupament dels nòduls limfàtics i la maduració de les cèl·lules B [235].

Per tant, tots aquests descobriments que RANK/RANKL esta involucrat en la formació d'osteoclasts, la resposta immune i que les cèl·lules T i B expressen RANKL foren passos molt importants per al coneixement d'aquest sistema.

La diferenciació dels osteoclasts està regulada doncs per varis factors de transcripció que s'activen gràcies a la interacció RANKL/RANK. La completa diferenciació dels osteoclasts per la via RANKL requereix de l'expressió seqüencial de NF- $\kappa$ B, c-Fos i NFATc1.



**Figura 3.** Transducció de senyals en relació a RANKL. Adaptat de Boyce F, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling

Per tal de reabsorbir os de forma efectiva, els osteoclasts s'han de fusionar entre ells. Per tal de poder fusionar-se requereixen d'una ATPasa bomba de protons (DC-STAMP) que secreta protons dels osteoclasts [228]. A més a més, els osteoclasts s'uneixen a la superfície de l'os utilitzant uns podosomes especialitzats rics en actina. A través d'aquests podosomes, formen unes unions estretes a la matriu òssia a través d'una membrana arrugada que ajuda a incrementar la superfície d'exposició dels enzims proteolítics (catepsina K i àcid hialurònic) a la superfície de l'os [236].

Ambdues característiques ajuden a que l'os es degradi mentre protegeixen les cèl·lules veïnes de l'efecte de l'àcid clorhídric.

Així doncs, l'activació de la senyal de RANKL i B-integrina determinen l'activació dels osteoclasts [237].

#### **6.4. RANKL**

La molècula de RANKL existeix com una proteïna homotrimèrica i generalment es troba unida a la membrana dels osteoblasts i cèl·lules T activades o bé la trobem secretada per les cèl·lules T activades [238]. La forma secretada de fet es resultat de proteolisi o splicing de la forma de membrana [239]

L'efecte proteolític sobre RANKL es realitza a través de metaloproteases de la matriu (MMP3 o MMP7) o ADAM (domini desintegrassa i metalloprotease).

La majoria de factors que estimulen l'osteoclastogènesi i l'activitat dels osteoclasts també indueixen l'expressió de RANKL per les cèl·lules osteoblàstiques. A més a més, RANKL també es troba altament expressat als nòduls limfàtics, timus, glàndules mamàries i pulmó i lleument expressat a altres teixit com la medul·lar òssia o la melsa. [238]. De fet, es troba expressat a les cèl·lules sinovials i cèl·lules T activades de les articulacions en pacients amb artritis reumàtica contribuint en part a la destrucció observada en aquests pacients.

RANKL també es troba expressat a les cèl·lules epitelials de les glàndules mamàries durant l'embaràs i de fet és un requeriment per a la hiperplàsia d'aquestes cèl·lules durant la lactància i la producció de llet segons va demostrar Fata JE et al en ratolins [240].

Podem objectivar expressió de RANKL a cèl·lules tumorals malignes que també expressin RANK i, doncs, podem determinar que aquesta sigui una via de proliferació cel·lular tant per un mecanisme tan autocrí com paracrí.

Estudis més recents van identificar el paper de RANKL en la migració de les cèl·lules tumorals cap a l'os[241].

La producció per les cèl·lules T de RANKL indueix l'expressió de INF $\beta$  pels osteoclasts activats a través de c-Fos, de forma que es regula la formació negativament. [242]. Aquest feedback negatiu pot ser potenciat gràcies a la sobreexpressió de INF $\gamma$  per les cèl·lules T. El INF $\gamma$  degrada TRAF6, un proteïna essencial per l'activació dels sistema RANK. INF $\gamma$  fou inicialment caracteritzat com una proteïna secretada per les cèl·lules T i NK

com a activador de macròfags. Ha demostrat ser un potent inhibidor de l'osteoclastogènesi in vitro a través de la inhibició del sistema RANKL [242, 243].

## **6.5. RANK**

És una proteïna de membrana homotrimèrica membre de la superfamília del receptor TNF.

Sembla trobar-se expressada en menys teixit que RANKL a nivell proteic, però a part de trobar-la en els osteoclasts en formació i cèl·lules dendrítiques, també s'expressa a les glàndules mamaríes i algunes cèl·lules cancerígenes (mama/pròstata) [244].

## **6.6. OPG**

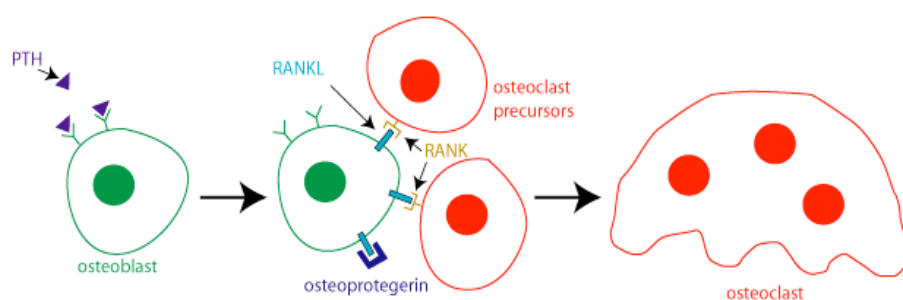
L'OPG és secretada per varis tipus cel·lulars a més dels osteoblasts, fins i tot les cèl·lules del cor, ronyons, fetge i melsa.

Estudis recents refereixen que les cèl·lules B serien responsables del 64% del total de la producció OPG del moll d'os. Aquesta afirmació sorgí arrel d'estudis on els ratolins deficients en cèl·lules B mostraren de forma constant osteoporosi [245].

La majoria de factors que comporten la inducció osteoblàstica de RANKL també regulen l'expressió osteoblàstica de OPG [246].



Tot i que trobem alguns estudis contradictoris, en general, la sobre-expressió de RANKL va paral·lela a la infra-expressió de OPG, de manera que la ratio RANKL/OPG canvia a favor de l'osteoclastogènesi [247]. El nombre i activitat dels osteoclasts s'incrementa o redueix en funció de cap a on tomba la balança RANKL/OPG. L'expressió de RANKL i OPG es troba regulada per hormones calcitròfiques. Quan la PTHrp i les citokines pro-resorció òssia s'uneixen als seus receptors corresponents en els osteoblasts al moll d'os, s'incrementen els nivells de RANKL respecte OPG, de manera que RANKL es troba disponible per interaccionar amb el receptor RANK en els precursors osteoclastics per tal de promoure'n la diferenciació i activar la resorció òssia.



---

**Figura 4.** Representació esquemàtica de la interacció RANKL-RANK-OPG

---

El paper de la OPG com a osteoprotectora en humans ve recolzada per què s'han objectivat deleccions homozigotes parcials en pacients amb malaltia de Paget juvenil. Es tracta d'una malalta autosòmica recessiva on els pacients mostren un increment del remodelat ossi, osteopènia i fractures [248].

L'expressió de OPG està regulada en els osteoblasts no només a través de varies citokines, hormones i factors de creixement que posteriorment mencionarem, sinó també per la Wnt-catenina. Aquesta catenina regula tan la formació d'os per part dels osteoblasts com la tendència de les cèl·lules mesenquimals a desenvolupar-se com osteoblasts.

### **6.7. Paper de RANKL/RANK/OPG en altres sistemes**

Mentre que OPG i RANK es troben àmpliament expressats en diferents teixits, l'expressió de RANKL es troba limitada en àrees de resorció òssia, glàndules mamàries i òrgans del sistema immunitari.

Els ratolins sense RANK ni RANKL no mostren ganglis limfàtics i són incapaços de fer créixer els petits ganglis que puguin tenir. Tot això indica el paper que juguen aquestes molècules en l'organogènesi [249] i desenvolupament de les glàndules mamàries [240].

A la glàndula mamària, RANKL és necessari per la diferenciació de les cèl·lules epitelials per tal de formar cèl·lules alveolars en ratolins embarassats. Aquest defecte es pot evitar administrant RANKL a la glàndula mamària de forma local [240].

RANKL té a més altres papers addicionals en la modulació del sistema immunitari. Sabem que RANKL es secretat per les cèl·lules T i és un factor important per la supervivència de les cèl·lules dendrítiques. De OPG sabem que s'uneix a la forma inactiva soluble de TRAIL (una proteïna de la família TNF amb activitat citotòxica).

En animals adults, el paper de RANKL i OPG en el sistema immunitari es encara poc clar, ja que en estudis animals amb transgènics amb elevats nivells de OPG el sistema immunitari resultà normal amb una expectativa de vida dins els límits de la normalitat.

## 7. PATOFISIOLOGIA DE LES METÀSTASIS ÒSSIES

Un elevat nombre de tumors metastatitzen de forma habitual a os, de fet, els millors exemple són mama i pròstata. La presència de cèl·lules tumorals a l'ós pot resultar en lesions osteolítiques, osteoblàstiques o mixtes. Les metàstasis osteoblàstiques es donen principalment en CaP.

Una de les principals característiques del CaP és la facilitat per desenvolupar metàstasis, de fet, entre el 80-100% dels homes que moren de CaP tenen metàstasis, és doncs la disseminació a l'os un dels factors rellevants que determinen el pronòstic i la morbiditat. [86]

A excepció dels tumors pròpiament ossis, les cèl·lules tumorals que metastatitzen a os requereixen una sèrie de característiques que els permetin separar-se del tumor primari, assentar-se a l'os, créixer i sobreviure. Això generalment requereix un canvi en el fenotip d'aquestes cèl·lules tumorals, amb modulació de les molècules d'adhesió, proteinases i factors de creixement. Els esdeveniments que comporten aquest canvi de fenotip i si aquests fets es mantenen al llarg del procés de metàstasis estan encara per determinar.

Les metàstasis òssies trenquen el procés normal de remodelació òssia incrementant el metabolisme de l'os que de passada facilita l'establiment de les metàstasis.

Determinats estudis han demostrat que l'activació dels osteoclasts és el primer pas per l'establiment de metàstasis òssies. De fet, la injecció de cèl·lules de CaP PC-3 (línia cel·lular refractària als andrògens) a ratolins comporta el desenvolupament de més metàstasis òssies que no pas els

ratolins control [250]. Això s'explica per l'augment en la resorció òssia propugnada per la deprivació androgènica (ja que s'evidencia un augment de l'activitat dels osteoclasts i per tant, de la pèrdua d'os). L'explicació fisiològica per la que els pacients amb CaP en deprivació androgènica pateixen una pèrdua de massa òssia és encara discutida; sembla ésser com descriuen Morote J et al 2006 que els pacients sotmesos a deprivació perden os trabècula en major proporció que os cortical i amb una corba de pèrdua més ràpida que les dones sotmeses a un dèficit d'estrògens; a més a més, es tracta d'homes que parteixen de base d'una densitat mineral òssia menor. Alguns autors com Bord S et al 2001 [251] descriuen la presència de receptors nuclears d'estrògens i andrògens en els osteoblasts que n'activarien el seu funcionament.

Un cop les cèl·lules tumorals es desenganxen del tumor primari i colonitzen la matriu òssia produeixen factors de creixement solubles que estimulen l'osteoclastogènesi. A més, els osteoclasts activats alliberen factors de creixement de la matriu òssia que estimulen el propi creixement cel·lular

Les metàstasis òssies es classifiquen d'acord amb el seu aspecte radiològic. Així doncs, trobem fenòmens d'osteolisi que es caracteritzen per la resorció òssia excessiva al voltant del tumor amb lleugera formació òssia; osteoblàstics amb molta formació d'os (escleròtiques); mixtes.

Les metàstasis de CaP són bàsicament osteoblàstiques però també s'associen a fenòmens de resorció òssia. De fet, sembla ser que l'endotelina 1 (ET-1) que es una factor de creixement produït per les cèl·lules de l'epiteli prostàtic que es detecta a elevats nivells de pacients amb CaP i metàstasis, és una estimulador potent de la proliferació osteoblàstica.

La raó per la que alguns tumors i no d'altres donen metàstasis a l'os i comporten un creixement osteoblastic és també poc clara. Sabem que el CaP habitualment metastatitza a les parts de l'esquelet ben vascularitzades, en concret, medul·la òssia de l'esquelet axial, extrems proximals ossos llargs, costelles i columna vertebral. La interacció entre les cèl·lules metastàtiques i l'os depèn del microambient en que es troben; alguns autors han suggerit que depèn de determinades característiques, incloent característiques anatòmiques, característiques pròpies del tumor i la capacitat del moll d'os per crear un ambient propici [252]. A part del microambient, cal també un sistema de remansament de grans quantitats de sang. Així, per exemple, Bubendorf L et al [253] descriuen els patrons metàstasis del CaP a partir de l'estudi d'autòpsies de 1589 pacients ratificant la teoria de Batson de disseminació metastàtica venosa a columna lumbar baixa a través del plexe venós vertebral (es tracta d'un plexe de baixes pressions i alt volum que permet el pas de les cèl·lules tumoral, el seu dipòsit i àmplies comunicacions amb els sistema venosos majors).

La importància d'aquest fet ja fou constatada per Paget l'any 1889 quan va proposar la teoria del "seed and soil". La cèl·lula tumoral (llavor) es pot disseminar àmpliament però només es dona creixement quan es localitzen en un medi adequat.

### **7.1. Com es donen les metàstasis?**

Ja he mencionat en el capítol previ que l'os humà consta de 3 parts: os cortical, os trabecular i medul·la òssia.

L'os cortical format per un petit nombre d'osteòcits i molt teixit ja mineralitzat que determina la forma de l'os. Quan les cèl·lules tumorals el desestabilitzen s'estableixen les fractures patològiques i el dolor. La major part de les citoquines i factors de creixement secretats pels osteoblasts s'emmagatzemen també a l'os cortical: Insulina-like growth factor –II (IGF-II),  $TGF\beta$ , IGF-I, PDEFG bFGF. Els 2 possibles mecanismes d'osteolisi que s'estableixen prèviament a les metàstasis osteoblàstiques són un mecanisme mediat per cèl·lules i un altre no mediat per cèl·lules:

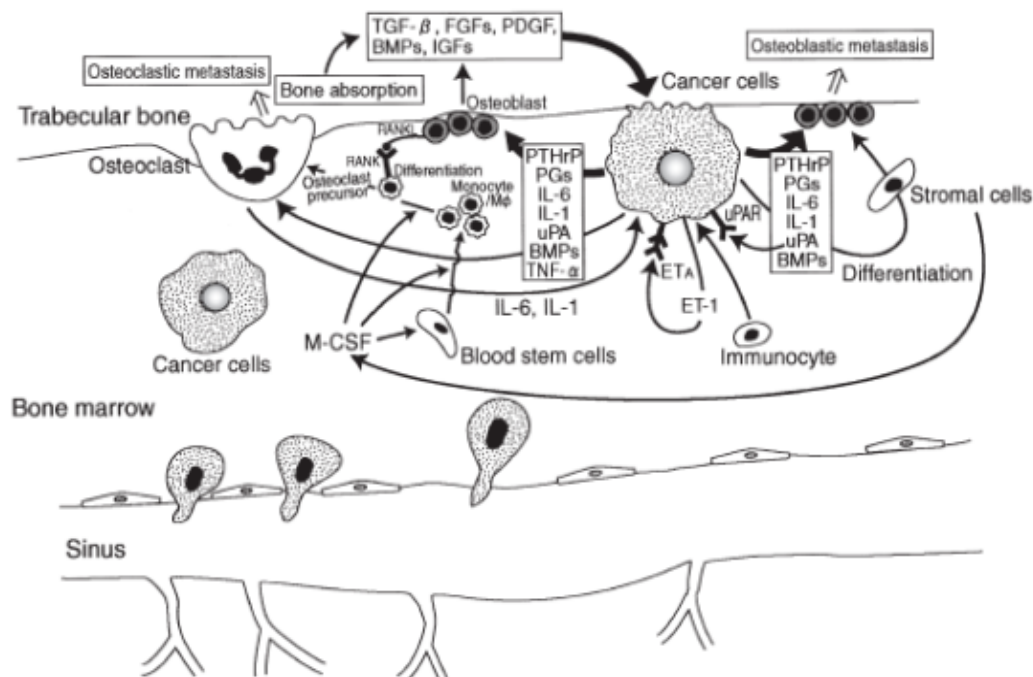
- Mediat per alliberament de factors lisants com les metaloproteinases per part de les cèl·lules tumorals, facilitant així la invasió.
- Activació dels osteoclasts per part de citoquines i factors de creixement ( $TGF\beta$ , PTHrp, IL-6,  $TNF\alpha$ , PDEGF, bFGF i prostaglandines) secretats pel tumor. El factor que més ens interessa a nosaltres és RANK (les cèl·lules tumorals estimulen l'expressió de RANKL a la superfície dels osteoblasts).

L'os trabecular en general més tou que l'os cortical. També hi té lloc la remodelació òssia. Els osteoclasts reabsorbeixen l'os i alliberen una sèrie de citoquines emmagatzemades en l'os cortical, aquestes citoquines juntament amb determinats factors de creixement, posteriorment estimulen la formació d'os pels osteoblasts, que al mateix temps estimulen el creixement de les cèl·lules tumorals. Així doncs, l'os és un microambient perfecte pel creixement de cèl·lules tumorals degut a l'elevat nombre de citoquines que s'hi secreten.

Finalment, la medul·la òssia és el lloc on es produeixen les cèl·lules del torrent sanguini. Hi trobem 2 tipus de cèl·lules mare: les cèl·lules mare que tenen el potencial de multi diferenciació a totes les cèl·lules sanguínies i als osteoclasts; i les cèl·lules de l'estroma que es diferencien a osteoblasts, cèl·lules musculars i adipòcits.

Les cèl·lules tumorals passen a través dels sinus venosos i entren a la medul·la òssia; envaeixen l'os trabeculat i finalment creixen a l'os cortical amb els 2 tipus de cèl·lules mare i els immunòcits.

Les interaccions entre aquestes cèl·lules es descriuen a la figura.



**Figura 5.** Representació esquemàtica de les interaccions cel·lulars en l'entorn de l'os. Adaptat del llibre Prostate Cancer - Capítol 2. Pag 13

Sabem que habitualment els CaP donen lloc habitualment a metàstasis òssies osteoblàstiques, però tot i això hi ha estudis



anatomopatològics de biòpsies òssies de metàstasis de pacients amb CaP que mostren un augment de la resorció [254]. De fet, Nemoto et al 1997 [255] mostren un augment de la concentració sèrica de piridolina (producte de degradació ossi) en pacients amb CaP metastàtic.

S'han descrit alguns models *in vivo* de metàstasis blàstiques que ens poden ajudar a entendre els mecanismes implicats en el desenvolupament de metàstasis d'aquest tipus. Aquests estudis tot just ens aporten dades que reforcen la idea que l'augment de l'activitat osteoclàstica és un punt crític pel desenvolupament de metàstasis blàstiques.

Recentment, Zhang et al 2000 [256] descriuen varies troballes interessants que van funcionar com a punt de partida per a varis estudis. En estudis inicials, van demostrar que les cèl·lules de CaP indueixen directament osteoclastogènesi a partir dels precursors osteoclastics en absència de cèl·lules d'estroma ossi *in vitro*. De fet, doncs, les cèl·lules de CaP deuen produir una forma soluble de RANKL que determina aquesta osteoclastogènesi. Per determinar tot això, utilitzen la injecció de cèl·lules de CaP intratibials i subcutànies en el mateix ratolí, administrant posteriorment OPG, de forma que la OPG evita l'establiment de patró lític de l'os sense mostrar cap efecte en el creixement del tumor subcutani. A més a més, s'objectiva un augment del nombre d'osteoclasts a la interfase tumor/os quan comparem els ratolins als que hem donat OPG i els que no (multiplicació per 8 dels osteoclasts a la interfase tumor/os). Aquests autors demostrant doncs per primera vegada que les línies cel·lulars de CaP produeixen factors solubles que indueixen l'osteoclastogènesi. En la mateixa línia de recerca, [257] descriuen la proteïna MMP-7 (metaloproteïnasa de la matriu) com una

proteïna que es troba augmentada en la interfase os-tumor (utilitzant un model de ratolí amb CaP que simula els canvis osteolítics i osteoblàstics associats al CaP metastàtic en home), produïda pels mateixos osteoclasts capaç de manipular RANKL a una forma soluble promotora de l'activació dels osteoclasts.

Arribat aquest punt caldria doncs, mencionar la sèrie de molècules implicades en l'establiment de les metàstasis osteoblàstiques.

## **7.2. Factors involucrats en el desenvolupament de metàstasis blàstiques**

Tot i que hi ha evidències que demostren que el desenvolupament de metàstasis òssies blàstiques és més complex del que ens pensàvem amb la resorció òssia precedint la formació d'ós, els mecanismes moleculars pels que això es dona són difícils d'entendre. Així doncs, és probable que les cèl·lules tumorals siguin tan capaces d'influir en la resorció com en la formació.

### **7.2.1. Factors implicats en l'estimulació de la formació osteoclasts en metàstasis osteoblàstiques**

Val la pena fer esment que els models animals experimentals de CaP amb metàstasis òssies s'estableixen a través de la inoculació intrarterial de les cèl·lules; no es poden establir per inoculació subcutània i/o venosa ja que

el pas a través dels pulmons altera les capacitats adhesives i per tan la capacitat per interaccionar amb l'os.

### **1. Hormona paratiroidea-like (PTHrP):**

La PTHrP fou inicialment identificada com un producte de les cèl·lules tumorals que podia induir hipercalcèmia [258]. Estudis posteriors han demostrat que la PTHrP juga un paper molt important en el desenvolupament de metàstasis òssies [259], tot i això el seu paper en les metàstasis osteoblàstiques és poc clar.

La PTHrP presenta un 70% d'homologia amb els 13 primers aminoàcids de l'extrem N-terminal de la proteïna PTH, s'uneix igualment al receptor PTH i realitza una funció biològica similar a la PTH.

Quan PTHrP s'uneix al receptor PTH estimula la resorció òssia a través dels osteoclasts i la reabsorció tubular renal de calci, produint doncs una hipercalcèmia.

L'alliberament de PTHrP és estimulat per EGF, IGF-1, IGF-2, TGF- $\alpha$ , TGF $\beta$ - que s'alliberen en els llocs de creixement tumoral.

Els nivells de PTHrP en sèrum i teixit de CaP s'han determinat per varis investigadors; entre ells Iwamura et al 1993 que descriuen en mostres de pacients amb CaP localitzat una intensitat de tinció de IHQ per PTHrP correlacionada amb el grau tumoral. Tot i que l'estudi no descriu l'expressió de PTHrP en cèl·lules de CaP amb metàstasis òssies (ja que només utilitza peces de prostatectomia radical) suggereix que la PTHrP produïda per les cèl·lules de CaP rarament va a la circulació i que la CALCITONINA, sovint

detectada a les cèl·lules neuroendocrines de la pròstata, probablement regula l'acció de la PTHrP donades les discrepàncies entre l'elevada expressió de PTHrP en les cèl·lules de CaP i la baixa incidència d'hipercalcèmia (<2%) en malalts amb CaP. A més a més, la PTHrP estimula la síntesi de DNA de les cèl·lules de CaP de forma autocrina i per tant, funciona com a factor de creixement segons descriu Iwamura.

Posteriorment Iddon J et al 2000 [260] descriuen una positivitat del 50% per PTHrP en les metàstasis òssies de pacients amb CaP.

## **2. Receptor activador de NF- kB (RANKL):**

Té varies denominacions RANKL, Osteoprotegerina ligand, factor de diferenciació dels osteoclasts o TRANCE.

S'ha determinat com un factor clau en el desenvolupament normal dels osteoclasts.

RANK-L fou descrit per 4 investigadors independents com a membre de la superfamília de factor de necrosi tumoral (TNF).

Existeixen 3 variants diferents de RANK-L:

1. Unida a membrana cel·lular (produïda per la majoria de teixits)
2. Ectodomini secretat a partir del RANK-L intracel·lular gràcies a canvis posttranscripcionals processat pel TNFa- converting enzym like (TACE). Únicament es dona en els teixits que produeixen TACE.
3. Forma soluble secretada pels limfòcits T i una línia cel·lular de carcinoma escamós

RANK-L es produït en varis teixit i tipus cel·lulars, però és més abundant a l'OS( cèl·lules osteoblàstiques) i TEIXIT LINFÀTIC (ric en cèl·lules T activades).

RANK-L s'ha demostrat que indueix la proliferació, diferenciació, supervivència, i fusió dels precursors osteoclastics; activa la maduració dels osteoclasts i inhibeix l'apoptosi dels osteoclasts madurs.

L'expressió de RANK-L esta regulada per diverses citoquines osteotròpiques, pèptids i hormones esteroidees.

Recentment, s'ha descrit una "hipòtesi de convergència" per la que on els 3 factors, RANK-L, RANK i OPG s'interrelacionen a nivell de la producció de RANKL per tal de regular la reabsorció òssia [261].

OPG funciona com inhibidor de RANKL. Forma part de la superfamília receptors TNF (la única que es secreta). La OPG també funciona com a inhibidor dèbil de TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), un altre membre de la superfamília TNF. L'expressió OPG com sempre està regulada per citoquines osteotròpiques, factors de creixement i hormones que modulen al resorció òssia.

OPG actua inhibint els 3 tipus de RANKL fet que comporta la inhibició de la proliferació, diferenciació, supervivència i fusió dels precursors dels osteoclasts, inhibició de l'activació osteoclasts i inducció apoptosi osteoclasts in vitro.

OPG es troba elevada en sèrum de pacients amb CaP avançat respecte als pacients amb CaP no avançat [262].

RANK és membre de la superfamília de TNFR transmembrana. Un cop RANK s'activa per RANKL, el RANK activat interacciona amb TRAF 1-6 (el més important dels quals és el TRAF 6). El senyal de transducció de RANK segueix 3 camins:

1. El camí JNK (c-jun N terminal) que modula c-fos i c-jun
2. El camí Nuclear factor-kB que regula l'osteoclastogènesi i la formació proteosoma
3. El camí serina/treonina quinasa (Akt/PKB) que inhibeix apoptosi, modula la reorganització citoesquelet i es correlaciona amb el camí NF-kB

RANK s'expressa de forma seqüencial en etapes tardanes de la diferenciació osteoclasts que expressen c-fms (el receptor cel·lular per M-CSF). M-CSF actua a l'inici de la diferenciació dels osteoclasts a induir l'expressió de RANK i coopera amb RANKL a induir la diferenciació, proliferació i supervivència de osteoclasts [263].

#### 7.2.2. Factors implicats en l'estimulació de la formació d'os en metàstasis osteoblàstiques

Els factors que estimulen l'activitat osteoblàstica no són clars.

Alguns estudis recents suggereixen que la línia cel·lular de CaP en os MDA Pca 2b induïren la proliferació i diferenciació osteoblàstica en ratolins, fet que posteriorment es va confirmar *in vivo* amb la injecció intrafemoral d'aquestes cèl·lules [264].

Tot i aquests estudis mostren que les cèl·lules de CaP poden produir factors que estimulin la resposta osteoblàstica, els factors específics segueixen indeterminats. Alguns factors de creixement s'ha implicat en l'increment de la resposta osteoblàstica tot i que en la majoria dels casos no hi ha evidència directa que estableixi la relació.

### **1. Transforming Growth Factor Beta (TGF $\beta$ ):**

TGF juga un paper molt important en la inducció de la diferenciació dels osteoblasts.

Es sintetitza pels osteoblasts en una forma latent que s'ha d'activar a través de la proteolisi o per un pH àcid a una forma activa.

El TGF activa l'expressió d'un ampli ventall de molècules importants per la funció dels osteoblasts com el col·lagen tipus I, fosfatases alcalines, osteonectina i osteocalcina.

Les cèl·lules de CaP produeixen TGF en una forma latent que fàcilment s'activa per les cèl·lules tumorals [265]. Tot i això no existeixen dades que directament relacionin el TGF amb la inducció de formació de nous os en cas de CaP metastàtic.

### **2. Proteïnes morfogenètiques de l'os: (PMO)**

Formen part de la superfamília de TGF $\beta$  (excepte la PMO-1). Són molècules importants en l'embriogènesi, organogènesi i morfogènesi durant el desenvolupament del fetus.

Alguns autors han descrit que aquestes proteïnes indueixen la formació d'os ectòpic *in vivo* i *in vitro* [266]. Les PMO inicien una sèrie d'esdeveniments que conclouen en la formació d'os. Alguns d'aquests

esdeveniments inclouen la recol·lecció de cèl·lules mesenquimals, la seva diferenciació a condrocits, angiogènesi i la diferenciació a osteoblasts.

Els osteoblasts en teixit ossi normal expressen PMO i sembla ser que són determinants en la formació d'os a partir osteoblasts.

De les 3 PMO ( PMO-2,4 i 6), només la PMO-6 estimula els osteoblasts de rates in vivo, fet que suggereix que la PMO-6 té un paper fonamental en la reacció osteoblàstica que es troba en les metàstasis òssies.  
[266]

Les PMO promouen la regulació de fosfatasa alcalina, col·lagen tipus I i l'expressió de osteocalcina. Arrel d'aquest fet, es van iniciar estudis que exploraven la possibilitat que les PMO juguessin un paper en el desenvolupament de metàstasis osteoblàstiques. De fet, Bentley et al 1992 [267] descriuen l'expressió de la proteïna BMP-6 en més del 50% dels pacients amb CaP metastàtic però no en pacients amb CaP no metastàtic i/o processos benignes. Posteriorment, Hamdy et al 1997 mencionen l'expressió de mRNA de BMP-6 en 95% cèl·lules prostàtiques de pacients amb CaP i metàstasis òssies però només el 18% de pacients amb malaltia localitzada i del 0% en teixit benigne. Tot i això en aquest estudi la IHQ va demostrar expressió de BMP-6 tant en hiperplàsia benigne de pròstata com en teixit maligne descartant-ne la selectivitat pel CaP.

Tot i que BMP-6 s'ha vist sobreexpressada en aquests articles no hi ha evidència directa que suggereixi una relació entre l'expressió i l'habilitat per promoure metàstasis osteoblàstiques.



Thomas R et al l'any 2001 [268] descriuen un nou membre de la família PMO, *placental bone morphogenetic protein*. Aquesta proteïna es troba sobreexpressada en teixit prostàtic normal; però a mesura que el tumor prostàtic progressa disminueixen els seus nivells. Quan estudien la seva expressió en els focus de metastasi òssia trobem de nou una sobreexpressió de la proteïna. Així doncs, quan les cèl·lules tumorals s'alliberen del tumor primari i tornen a créixer de nou en un altre lloc poden reexpressar determinats gens que juguen un paper diferent que al tumor primari.

Estudis recents de Feeley et al 2005 [269] confirmen la influència de PMO en el desenvolupament i progressió de lesions osteoblàstiques. Aquest grup utilitza la injecció de línies cel·lulars prostàtiques metastàtiques en tibia de ratolins SCID. Observen que BMP-2 i 7 estimulen la migració cel·lular i invasió de les cèl·lules prostàtiques tumorals en forma dosi-depenent.

### **3. Insulin-like Growth Factors (IGF):**

IGF és un sistema complex que inclou IGF-1 i 2, com a mínim 6 IGF binding proteins i dos receptors.

IGF-1 i 2 es sintetitzen pels osteoblasts i estan presents en la matriu òssia. Les IGF s'alliberen de l'ós durant el procés de resorció òssia i d'aquesta manera poden regular l'activitat osteoblàstica. En sèrum les IGF circulen unides a proteïnes (IGFBP) que modulen la seva acció proliferativa.

Aquestes molècules són capaces d'estimular la proliferació de les cèl·lules osteoblast-like i estimular la síntesi de col·lagen tipus I *in vitro*. De fet, IGF-1 s'ha involucrat amb un increment de risc de CaP.

En cultius *in vitro*, les cèl·lules de l'epiteli prostàtic expressen IGF i IGFBP.

Alguns autors com Kanety H et al 1993 [270] van descriure un increment de IGFBP-2 en pacients amb CaP metastàtic comparat amb els seus controls, així com un descens de IGFBP-3 en pacients amb CaP metastàtic, més accentuat en pacients amb CaP avançat. S'observà al mateix temps una correlació positiva entre PSA i IGFBP-2.

Harman S et al 2000 [271] arriben a la conclusió que les IGFBP estan involucrades en el creixement del CaP i que podrien utilitzar-se com a marcadors en sèrum.

Cohen et al 1993 [272] van descriure que IGFBP3 en sèrum no mostraven uns nivells significativament diferents en pacients amb CaP comparant-los amb els controls; però si que constataren les troballes de Kanety H et al [270] de manera que les concentracions en sang de IGFBP-3 són menors en pacients amb metàstasis òssies quan es comparen amb els controls.

Per tant, basant-nos en les observacions que les cèl·lules de CaP expressen components del sistema IGF i que el sistema IGF regula l'activitat dels osteoblasts, s'ha suggerit que la producció a nivell local de IGF a l'os ha de contribuir d'alguna manera a la formació d'os en CaP metastàtic.

#### **4. Fibroblast Growth Factor (FGF):**

Els FGF formen part de la família dels heparin-binding growth factors. Són doncs potents reguladors de la proliferació i diferenciació cel·lular.

Els FGF s'acumulen a l'os i s'alliberen durant el procés de resorció òssia, estimulen la proliferació dels osteoblasts i regulen la síntesi d'altres factors de creixement també importants en el metabolisme ossi. Tot això ho

sabem gràcies a la identificació de mutacions en els receptors de FGF que donen lloc a determinades malalties com la craniosinostosi o l'acondroplasia.

Molts estudis han demostrat que les línies cel·lulars de CaP produeixen FGF [273]. Estudis sobre altres línies cel·lulars diferents que també donen lloc a metàstasis blàstiques, han mostrat augment de FGF. Tot això, dóna peu a pensar que el FGF produït podria contribuir al desenvolupament de respostes blàstiques, tot i que no hi ha cap estudi definitiu que ho constati.

### **5. Endotelina-1 (ET-1):**

Endotelina és una molècula bàsicament vasoconstrictora produïda per les cèl·lules endotelials. Dels 3 subtipus descrits, ens interessa remarcat la ET-1, produïda per l'epiteli prostàtic

De fet, trobem elevades concentracions en sang d'aquesta molècula en homes amb CaP metastàtic quan ho comparem amb homes amb CaP localitzat.[274]

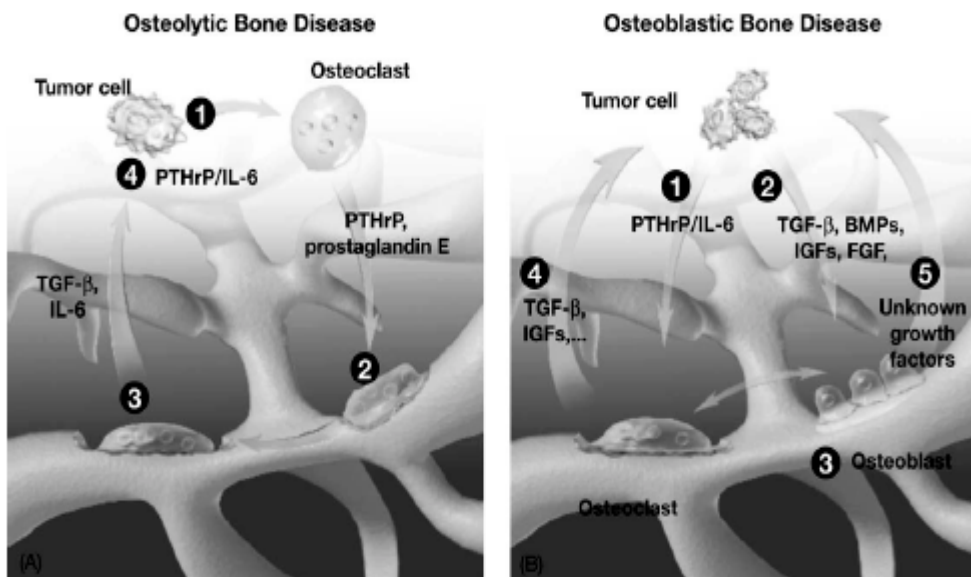
És una molècula amb alta afinitat pels receptors de ET-1 distribuïts per tota la glàndula prostàtica.

S'ha demostrat que ET-1 és un potent mitogen per cèl·lules similars a osteoblasts i que modula els nivells fosfatasa alcalina *in vitro* [275]. Tot això és doncs suggestiu de que ET1 juga un paper crític en el desenvolupament de metàstasis osteoblàstiques en el CaP.

Tot i que els factors descrits fins ara s'han implicat en el desenvolupament de metàstasis osteoblàstiques sovint hi ha poques evidències que ens demostrin la relació. Així doncs, probablement en el futur trobarem d'altres factors que sabem que promouen la formació d'os i que

també són produïts per les cèl·lules tumorals potenciant doncs les metàstasis osteoblàstiques.

El desenvolupament de metàstasis osteoblàstiques és doncs una cadena d'esdeveniments que inclou l'habilitat de les cèl·lules metastàtiques per desenganxar-se del tumor primari, capacitat per migrar a l'os i la capacitat per estimular la formació d'os. És probable que una sèrie de factors de creixement local, molècules d'adhesió i proteïnases contribueixin a aquesta activitat, tot i que encara són desconegudes per nosaltres. Els estudis més recents suggereixen que la resposta osteoblàstica probablement va precedida d'una resposta osteoclàstica; aquestes conclusions són resultat de la recerca de factors produïts per les cèl·lules tumorals productores d'ambdós factors.



---

**Figura 6.** Patofisiologia de les metàstasis òssies. (Adaptat de Pathophysiology of bone metastasis. Abrahamsson Per-Anders. Eur Urol Suppl 3 2004. 3-9)

OSTEOLITIC: 1. Cèl·lula tumoral allibera factors humorals que estimulen els osteoclasts. 2. Osteoclasts trenquen l'òs. 3. Alliberament de factors que estimulen el creixement de cèl·lules tumorals. 4. A mesura que tumor creix allibera substàncies que incrementen l'activitat dels osteoclasts.

OSTEOBLASTIC: 1. Cèl·lules tumorals alliberen factors que estimulen els osteoclasts. 2. Factors que estimulen els osteoblasts per les cèl·lules tumorals. 3. Excés de formació d'os. 4. Amb l'activitat osteoclàstica s'alliberen factors que estimulen el creixement tumoral. 5. Activació osteoblasts estimula l'alliberament de factors que també estimulen el creixement tumoral.

---

## **8. MARCADORS DE REMODELACIÓ ÒSSIA**

Els marcadors bioquímics de remodelació òssia son una forma no invasiva i relativament barata d'avaluar la remodelació òssia en les diferents malalties de l'os.

Cal tenir en compte que molts dels marcadors que descriure a continuació reflecteixen tan la formació com la destrucció d'os (osteocalcina, hidroxiprolina). A mes a mes, tots aquests marcadors es troben presents en altres teixits a part de l'os i per tant, es troben influïts per altres malalties, no únicament les òssies.

### **8.1. Marcadors de formació òssia**

Es tracta de productes derivats directa o indirectament d'osteoblasts actius. Els mes utilitzats son la fosfatasa alcalina òssia [276], osteocalcina i els propeptids del col·lagen tipus I.

#### **1. ALP:**

Es tracta d'un enzim de membrana cel·lular. La ALP total consisteix en varies formes dimèriques originades de diferents teixits com el fetge, os, intestí (10%), melsa, ronyo i placenta (totes aquestes formen la fosfatasa alcalina total). A mes a mes, alguns tumors expressen formes macromoleculares de ALP. En adults, les formes provinents de ronyo i fetge (BLAP) representen el 50% del total. Donat que la majoria de kits inclouen la detecció d'aquesta molecular segueix sent el marcador mes utilitzat per mesurar la formació d'os. S'eleva en la infantesa i adolescència degut al

creixement, en les fractures òssies, en les malalties òssies (tant primàries com metastàtiques), hiperparatiroidisme primari/secundari, malaltia de Paget de l'os i en la malaltia obstructiva hepàtica. Un cop descartades les hepatopaties podem tenir una mesura mes o menys correcte de l'activitat dels osteoblasts. Tot i això, donada la major especificitat de ALP específica de l'os (BALP) actualment s'utilitza en la majoria de contextos [277, 278].

## **2. OSTEOCALCINA:**

Es la proteïna no-col·làgena majoritària de la matriu òssia. Extremadament rica en àcid glutàmic, pel que també s'anomena bone GLA protein. A part de l'os també la trobem a la dentina i cartílag calcificat. Últimament, s'ha descrit la seva presència en osteosarcomes, tumors ovàrics, pulmonars, cerebral i pròstata [279]. La funció de l'osteocalcina es encara poc clara però sembla que serveix com a lloc de dipòsit pels cristalls d'hidroxiapatita. El seu increment en sang s'associa a la mineralització de l'os, però les concentracions no son sempre paral·leles a les de BALP i moltes vegades se n'allibera part també durant la resorció òssia.

L'osteocalcina en sang es troba present en molt variades formes que deriven de la fragmentació de la molècula intacte. Degut a l'heterogeneïtat dels anticossos utilitzats en la mesura de l'osteocalcina i la seva diferent interacció amb els múltiples fragments, els valors obtinguts amb els diferents kits comercials son difícilment comparables.

Els nivells d'osteocalcina es troben forca influenciats per l'edat, gènere o la funció renal [280]. Augmenten els nivells en les etapes de creixement, hiperparatiroidisme primari i secundari, hipertiroïdisme i en cas d'insuficiència

renal; disminueixen en l'hipotiroïdisme i en cas de tractament amb corticoides.

### **3. PROPEPTID CARBOXITERMINAL DE PROCOLLAGEN TIPUS I (PICP):**

El col·lagen tipus I fabrica el 90% de la matriu òssia i es secretat pels osteoblasts en forma de procol·làgen. Qualsevol teixit que sintetitza col·lagen tipus I (os, pell) allibera propèptids a la sang pel que aquest marcador es encara menys específic que l'osteocalcina o la BALP.

El PICP s'ha correlacionat amb mesures histomorfomètriques de formació d'os [281], així com el tractament de supressió androgènica pel CaP o el tractament amb bifosfonats comporten una reducció en plasma d'aquest marcador [282, 283]. El PICP es troba augmentat en la malaltia de Paget de l'os i en la menopausa.

## **8.2. Marcadors de degradació òssia**

La majoria de marcadors de resorció òssia son productes de degradació del col·lagen de l'esquelet. Tot i això, enzims específics dels osteoclasts com la fosfatasa àcida tartat-resistent i proteïnes no col·làgenes com la BSP també han demostrat reflectir els processos de resorció òssia.

### **8.2.1. Producte de la síntesi d'osteoclasts: fosfatasa àcida tartat resistent**

Pertany a la família dels isoenzims de la fosfatasa àcida que es troben a l'os, plaquetes, pròstata, eritròcits i melsa.



L'isoforma específica de l'osteoclast, TRAcP 5b es un enzim lisosomal secretat pels osteoclasts actius [284, 285]. Els nous kits d'immunoanàlisi permeten detectar selectivament l'isoforma TRAcP 5b.

L'activitat de l'isoforma TRAcP 5b s'ha demostrat elevada en la malaltia de Paget òssia, hiperparatiroidisme primari, osteomalàcia i en les metàstasis òssies del càncer de mama i pròstata [286].

### 8.2.2. Productes de la degradació de la matriu mineral: calci urinari

Els nivells de calci urinari depenen evidentment de la funció renal, de la ingesta diària de calci i vitamina D. Es consideren doncs com a una generalització del l'homeòstasi del calci a l'organisme i no com a una valoració de la resorció òssia.

### 8.2.3. Productes de la degradació de col·lagen

#### **1. HIDROXIPROLINA:**

El col·lagen tipus 1 es ric en l'aminoàcid hidroxiprolina. L'hidroxiprolina té una estructura en triple hèlix amb entrecreuaments entre els aminoàcids de lisina o hidrolisina. Aquests entrecreuaments s'anomenen *crosslinks* i són pyridinolines i deoxypyridinolines que s'alliberen en el procés de resorció òssia.

La majoria de l'hidroxiprolina prové de la degradació del col·lagen tot i que no es la única font, la fracció C1q del complement conté també quantitats significatives d'aquest aminoàcid.

L'excreció d'hidroxiprolina en orina es veu influïda per alteracions en la funció hepàtica, la funció renal i la dieta. Per tant, es un marcador que te poca sensibilitat i especificitat per avaluar els canvis subtils en la resorció òssia. Tot i això, moltes vegades s'utilitza com a marcador de resorció en l'hiperparatiroidisme/hipoparatiroidisme i en el tractament de la malaltia òssia de Paget. [287, 288]

## **2. CROSSLINKS DEL COL.LAGEN: PIRIDOLINA I DEOXIPRIDOLINA:**

Piridolina i deoxipiridolina son àmpliament utilitzades com a marcadors de resorció òssia. Mentre que la piridolina es distribueix àmpliament en varis teixits de l'organisme, la deoxipiridolina només es troba en el col·lagen de l'os i la dentina. Ambdós components s'alliberen al torrent sanguini al desintegrar-se el col·lagen i l'anàlisi histomorfomètric mostra que l'excreció urinària es correlaciona amb la resorció òssia [289].

Els crosslinks s'elevan a la infantesa i adolescència, en la menopausa, malaltia de Paget òssia, hiperparatiroidisme i hipercalcèmia maligne.

## **3. TEL.LOPEPTIDS N TERMINAL DE COL.LAGEN TIPUS I (NTx):**

En el procés de resorció òssia, juntament amb els crosslinks s'alliberen fragments N i carboni terminals del col·lagen. Aquests fragments amb els crosslinks associats s'anomenen **tel.lopeptids**. El N-tel.lopeptid (NTx) generalment es mesura en orina per immunoanàlisi, mentre que el pèptid C-terminal (CTx) es mesura principalment en mostres sanguínies. L'anticòs monoclonal per la detecció de NTx en orina actua contra la cadena  $\alpha 2$  dels col·lagen tipus I i per tant, no reconeix altres crosslinks [290].

Demers LM et al [291] ja fa temps van descriure els nivells de NTx en orina com a una eina per diferenciar malalts amb càncer amb i sense metàstasis òssies. A mes a mes, els mateixos autors varen demostrar que els nivells en orina de NTx i els nivells en sèrum de fosfatasa alcalina específica de l'os, en pacients amb càncer i metàstasis mostraven una correlació directa ( $p < 0.05$ ) amb el nombre de localitzacions metastàtiques.

Posteriorment, Brown JE et al [292] van demostrar que la mesura mensual de NTx en orina en 121 pacients amb càncer metastàtic en tractament amb bifosfonats, donava una forta correlació entre la taxa de resorció òssia i la freqüència de complicacions òssies relacionades. El mateix autor tot seguit, en un article posterior, va demostrar que la mesura cada 3 mesos dels nivells urinaris de NTx en pacients amb CaP i altres tumors, funcionaven com indicadors d'esdeveniments ossis, temps fins al primer esdeveniment ossi i temps a la progressió i mort per CaP. De fet, en els malalts amb CaP s'observa un increment de 3 vegades el risc d'esdeveniments ossis en malalts amb nivells de NTX orina elevats en relació amb nivells NTx orina baixos.

Recentment en un altre estudi randomitzat en pacients amb CaP i metàstasis òssies, es van estratificar els pacients en funció dels nivells urinaris de NTx (normal:  $< 64$  nmol/mmol, elevats:  $\geq 64$  nmol/mmol ); Els nivells de NTx urinària elevats es normalitzaren als 3 mesos d'iniciar el tractament amb bisfosfonats en el 70% de pacients que els tenien elevats. Entre els pacients que partien de nivells urinaris de NTx normals, el 96.7% els mantingueren normals als 3 mesos de tractament amb bisfosfonats, mentre que només el 66% dels que van rebre placebo mantenien nivells dins la

normalitat.[293]. La normalització dels nivells elevats de NTx urinària a través de l'àcid zoledrònic s'ha associat fins a un 60% de reducció en el risc de mort en comparació amb els pacients en que els nivells es mantenen elevats per 3 mesos.

Correlacions entre els nivells de normalització de NTx urinària durant el tractament amb bisfosfonats s'han establert en 3 estudis randomitzats. Aquests estudis mesuren els nivells de uNTX basals i als 3 mesos en malalts amb càncer de mama, CaP hormonorefractaris i càncer de pulmó no cèl·lula petita rebent zoledrònic o placebo. La normalització dels nivells de uNTX als 3 mesos de tractament s'associa a una reducció del risc d'esdeveniments ossis i molt en comparació amb els malalts amb nivells persistents [294].

Orina	Sang	
<i>Resorció òssia</i>	<i>Resorció òssia</i>	<i>Formació òssia</i>
Calci (Ca/Cr)		BALP
Hydroxyproline	N-telopeptid	Osteocalcina
N-telopeptid de col·lagen tipus I (NTX/Cr)	C-telopeptid	Regió C-terminal del peptid de procol.làgen tipus 1 (P1CP)
C-telopeptid de col·lagen tipus I (CTX/Cr)	Telopeptid C-terminal de col·lagen tipus I (ICTP)	
Pyridinoline (PYD/Cr)	RANKL/OPG ratio	Regió N-terminal del pèptid de procol.làgen tipus 1 (P1NP)
Deoxypyridinoline (DPD/Cr)	TRAcP	

---

**Taula 6.** Tipus de marcadors ossis.

---

Els marcadors de remodelació òssia es corregeixen en funció dels nivells de creatinina urinària

### 8.3. Correlació dels marcadors ossis amb les troballes clíniques

Marcador ossi	Troballes clíniques
<b><u>BALP</u></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• En pacients amb CaP vs controls</li> <li>• Durant el tractament amb zoledronic vs placebo</li> </ul>	<p>Presència de metàstasis òssies</p> <p>Temps fins a l'esdeveniment ossi, fractura patològica o mort</p>
<b><u>CTX</u></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• CaP</li> </ul>	Presència de metàstasis òssies, resposta al pamidronat
<b><u>Deoxypyridinolina</u></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dones premenopausiques normals</li> </ul>	Augment de la incidència de noves fractures vertebrals
<b><u>Hydroxyprolina</u></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• CaP</li> </ul>	Presència de metàstasis òssies
<b><u>ICTP</u></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• En tots els tumors</li> </ul>	Nivells de dolor ossi
<b><u>NTX</u></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• En pacients amb càncer</li> <li>• En dones postmenopausiques</li> </ul>	<p>Presència de malaltia òssia avançada</p> <p>Temps fins a la progressió i mort</p> <p>Prediu el benefici en la supervivència si tractem amb zoledrònic</p>

## **OSTEOCALCINA**

- **CaP**
- **Pacients amb càncer i no-càncer**

Presència de metàstasis òssies

Presència de fractura, metàstasis òssies no irradiades o malaltia de Paget

## **TRAcP-5b**

- **CaP vs controls**

Presència de metàstasis òssies i el seu tractament

Presència de lesions òssies precoces.

**Pacients amb càncer vs dones post menopàusiques**

## **9. ACTUALITZACIÓ BIBLIOGRÀFICA DE L'ESTUDI EXPRESSIÓ IMMUNOHISTOQUIMICA DE RANKL**

Varis estudis en els últims anys descriuen l'existència d'una estreta relació entre determinats factors presents en les cèl·lules CaP i la posterior aparició de metàstasis òssies (de lluny les més freqüents en aquesta malaltia).

Tot va començar arrel de determinats autors que descrigueren diverses molècules integrades en el procés constant de remodelació òssia. De fet, la majoria d'articles descrits prèviament expliquen bàsicament molècules implicades en el procés osteolític i/o osteoblàstic però únicament en la literatura més recent hi trobem referències al procés descrit en CaP d'establiment primer de processos osteolítics que en segon terme donen lloc a processos majoritàriament osteoblàstics.

De totes les molècules descrites en aquest procés d'establiment de metàstasis òssies i remodelació òssia a nosaltres ens interessa mencionar especialment RANKL i de rebot RANK i OPG (directament implicades en el procés).

Lacey et al ja l'any 1998 descriuen la molècula RANKL com una molècula crítica en la diferenciació osteoclastica a través de la modulació genètica que caracteritza el fenotip osteoclastic mitjançant l'estudi amb ratolins; és doncs una descripció clau que serveix de punt de partida als estudis posteriors.

Posteriorment varis estudis sobre la molècula OPG l'estableixen com a molècula inhibidora de l'osteoclastogenesi en el microambient de l'os. Zhang

J et al estableixen un model muri on s'observa l'aturada del creixement tumoral en les injeccions de cèl·lules intraòssies i no en les subcutànies .

Es fa doncs plausible la idea que les cèl·lules de CaP, a través de la producció d'enzims proteolítics com el PSA o metalloproteases captin el domini extracel·lular de RANKL resultant en la producció de RANKL. De fet Koeneman KS et al, al 1999 ja descriuen la possibilitat de que les cèl·lules de CaP progressin a un fenotip osteoblastic-like que inclou la producció de proteïnes com sialoproteïna i osteonectina, Cbfa1 (factor de transcripció específic-osteoblast), la capacitat per produir hidroxiapatita in vitro i com no la sobre-expressió de RANKL com a part de tot aquest fenomen.

A partir de tots aquests plantejaments, i partint dels coneixements actuals sobre el metabolisme ossi, el nostre estudi planteja la descripció de RANKL a les mostres de biòpsies prostàtiques transrectals ecoguiades. Únicament tres articles a la literatura actual parlen sobre l'expressió IHQ en teixit prostàtic d'aquesta molècula.

El primer article que cal mencionar és el de Brown JM et al 2001 que descriu un percentatge de cèl·lules CaP expressant RANKL i OPG en major nombre en les metàstasis òssies comparat amb aquells que tenen metàstasis en altres localitzacions, suggerint doncs un mecanisme d'interacció recíproca entre les cèl·lules CaP i cèl·lules de l'os. A més, es descriu una tinció principalment nuclear de OPG de forma que la seva biodisponibilitat es redueix, fet que comporta en total un augment de la biodisponibilitat de RANKL estimulando doncs la resorció òssia i provocant l'alliberament de factors de creixement. El principal inconvenient però d'aquest article n'és el



baix nombre de casos (n=28) fet que dificulta la correcta obtenció de conclusions fermes.

El segon article que cal mencionar es el de Chen G et al 2006. Aquest article utilitza 89 pacients amb CaP, 48 amb estadi localitzat i 41 disseminats (11 amb N1 i 30 amb M1) sense bloqueig hormonal. L'estudi determina l'expressió de RANKL, RANK i OPG en línies cel·lulars de CaP, l'expressió de RANKL, RANK i OPG en teixit de CaP i correlaciona aquests resultats amb determinats paràmetres clinicopatològics de CaP. L'anàlisi del teixit amb CaP evidencia una expressió de RANKL (31%), RANK (38%) i OPG (19%) en el tumor primari. En els tumors CaP metastàtic l'expressió de RANKL (44%), RANK (49%) i OPG (73%) fou significativament superior als tumors localitzats. S'observa a més una tinció IHQ més intensa per RANKL, RANK i OPG en teixit limfàtic i metàstasis òssies (47%, 50%, 83% respectivament) si ho comparem amb el tumor primari. L'augment de l'expressió de RANKL, RANK i OPG es correlaciona amb el Gleason, TNM, estat androgènic, i PSA en els malalts amb CaP; tot i això aquesta correlació clinicopatològica només es va poder establir amb les dades de 48 malalts del total de 98 estudiats. Així, doncs, torna a ser el nombre de pacients estudiats una altra flaqueza d'aquest estudi que dificulta l'obtenció de conclusions. Tot i això, en resum conclouen que l'expressió de RANKL/RANK/OPG es correlaciona amb CaP metastàtics, avançats i més agressius suggerint doncs un paper d'aquesta molècula en el diagnòstic, pronòstic i tractament d'aquests malalts.

El tercer article de Perez-Martinez FC et al 2007 analitza 3 citoquines (PTHrp, OPG, RANKL) del punt de vista IHQ per a determinar el potencial d'agressivitat en el CaP localitzat. Divideixen els pacients en baix risc

(Gleason 6 o 7(3+4)) o alt risc (Gleason 7 (4+3) o més). Aquest article utilitza 47 pacients amb CaP localitzat (23 amb prostatectomia radical/24 amb RTUp). Descriuen un 82% de positivitat per RANKL al CaP baix risc i 96% de positivitat per RANKL al CaP alt risc. La immunoreactivitat de RANKL és superior en la zona tumoral respecte a l'epiteli normal i en els tumors d'alt risc versus els de baix risc. Aquests autors utilitzen la ratio RANKL/OPG per descriure la situació. Així doncs, s'observa una ratio 0.51 a les zones neoplàsiques i de 0.26 al teixit normal, que foren significativament inferiors ( $p < 0.05$ ) respecte els tumors l'alt grau (0.87 i 0.72). Arriben a la conclusió que la combinació de l'ús de varis marcadors de recanvi ossi (PTHrp i RANKL) ajuda a diferenciar entre els CaP de baix i alt risc en la majoria de casos. L'inconvenient en aquest cas és l'absència de grup control, és a dir, no introdueix cap pool de pacients amb CaP metastàtic per veure si hi ha diferències també en aquests pacients.

## **HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS**

---

Les metàstasis òssies en pacients amb CaP són responsables de gran part de la morbiditat i mortalitat associada a aquestes neoplàsies.

RANKL (receptor activator of NF-kappa beta ligand) és una molècula implicada en la regulació de la reabsorció òssia i el remodelatge de l'os. A més a més, el sistema RANK/RANKL ha demostrat, ja en estudis previs, jugar un paper important en el desenvolupament i establiment de les metàstasis òssies.

Recentment, s'ha demostrat per primera vegada que la inhibició de RANKL retarda l'aparició de metàstasis òssies en pacients amb alt risc de disseminació [295].

La nostra hipòtesi de treball és que l'expressió IHQ de RANKL en el teixit tumoral primari dels pacients afectes de carcinoma prostàtic és predictor de disseminació òssia i probablement podria seleccionar els pacients candidats a beneficiar-se del tractament inhibitori de RANKL.

Els objectius plantejats en el nostre treball han estat:

1. Analitzar l'expressió IHQ de RANKL en el tumor primari en funció de l'existència o no de metàstasis òssies.
2. Relacionar l'expressió IHQ de RANKL en el tumor primari de pacients amb CaP i malaltia òssia disseminada en funció de l'extensió de la malaltia òssia.

3. Relacionar l'expressió de RANKL en el tumor primari de CaP en pacients sense disseminació metastàtica en funció del risc de disseminació.
4. Relacionar l'expressió de RANKL en el tumor primari de CaP en funció del tipus de metàstasi.
5. Relacionar l'expressió de RANKL en el tumor primari de pacients amb CaP com a predictor de metàstasis òssies.
6. Analitzar l'expressió de RANKL en el tumor primari de CaP com a factor predictor de supervivència en pacients amb metàstasis òssies.

Objectiu addicional:

7. Analitzar l'especificitat de l'anticòs utilitzat per a la detecció IHQ de RANKL amb l'expressió a nivell proteic en línies cel·lulars de CaP.

## **MATERIAL I MÈTODES**

---

## **1. MATERIAL**

Es tracta d'un estudi retrospectiu que inclou varis cohorts de pacients en els que s'ha analitzat l'expressió IHQ de RANKL en el tumor primari.

Recollim retrospectivament 2 grups de malalts:

### **1.1. Grup d'estudi**

Un total de 198 pacients amb diagnòstic histològic de CaP i metàstasis òssies al debut (dels quals únicament 176 foren aptes per l'estudi.

Els 22 pacients exclosos ho foren degut al dèficit de teixit prostàtic en els blocs de parafina restants en el banc de teixit del Servei d'Anatomia Patològica.

Es tracta d'una cohort tancada de pacients diagnosticats entre l'any 1984 i 2000 i seguits amb controls periòdics de PSA fins al seu èxitus.

Les característiques dels pacients es veuen representades en la següent taula (Taula 7).

Variable	
Numero de pacients	176
EDAT (anys)	68.6 (51-96)
PSA (ng/mL)	27.5 (3.2 – 900)
Suma de GLEASON n (%)	
2-6	36 (20.5)
7	39 (22.2)
8-10	101 (57.4)
ESTADIATGE T clínic n (%)	
T1	56 (31.8)
T2	41 (23.3)
T3	48 (27.3)
T4	31 (17.6)
ESTADIATGE N clínic n (%)	
No Ganglis	152 (86.4)
Ganglis pelvics	9 (5.1)
Ganglis retroperitoneals	9 (5.1)
Ganglis a distancia	6 (3.4)
ESTADIATGE M clínic n (%)	
No metàstasis	84 (47.7)
Metastasis ossies	68 (38.6)
Metastasis limfàtiques	9 (5.1)
Metastasis ossies i limfàtiques	15 (8.5)
Extensió de la malaltia n (%)	
0	84 (48.0)
1	44 (25.0)
2	18 (10.0)
3	27 (15.0)
4	3 (2.0)

Variables qualitatives expressades com n (%)

Variables quantitatives expressades com mediana- rang interquartil

---

**Taula 7.** Característiques de les variables clinicopatològiques incloses el grup estudi.

---



El diagnòstic de CaP en aquesta cohort de malalts fou per biòpsia prostàtica transrectal ecogràficament guiada per sextants. El protocol habitual per a la biòpsia prostàtica transrectal inclou la neteja del recte les 12 hores prèvies al procediment, així com la presa de cobertura antibiòtica d'ampli espectre. Durant el procediment es col·loca el pacient en posició de litotomia forçada, s'administra anestèsia local periprostàtica (10 ml mepivacana), es realitza una ecografia transrectal bidimensional per a la localització prostàtica, mesura de volum i visualització de calcificacions intraprostàtiques. Tot seguit es practica la presa sistemàtica de biòpsies per sextants amb transductor 145 (Falcon 2101, B-K Medical Inc) i agulla tipus trucut de 18 inch (Bard Inc). Les mostres de cilindres prostàtics es guarden en formol per al transport i posterior processament al servei d'anatomia patològica.

Tots els pacients van rebre tractament hormonal amb supressió androgènica ja sigui quirúrgicament (orquiectomia subalbugínia) o bé químicament (bloqueig hormonal complet o únicament anàlegs LHRH). Els tractaments hormonals foren oscil·lant en el seguiment dels pacients en funció de les diferents determinacions de PSA i la simptomatologia associada.

L'estadificació clínica dels malalts es va realitzar mitjançant l'exploració física (incloent tacte rectal) dels pacients, determinació de PSA (tots els malalts mostraren PSA >50) i les metàstasis òssies foren detectades amb gammagrafia òssia i estratificades segons la classificació de Soloway [296]. Aquests autors basen els seus resultats en un estudi sobre 166 pacients amb

CaP i metàstasis òssies, en tractament amb supressió androgènica. Utilitzen un sistema de gradació semi quantitatiu per tal d'avaluar l'extensió de la malaltia òssia (EOD) basat en la gammagrafia òssia. Soloway et al [demostran que s'evidencia una diferència estadísticament significativa en la supervivència dels pacients amb EOD I (94%) i EOD IV (40%) als 2 anys de seguiment. Així doncs, donen evidència científica per reclamar l'ús de la seva classificació en l'avaluació de la malaltia òssia en malalts amb CaP i metàstasis òssies. Arrel d'aquestes evidències en el nostre estudi vàrem decidir incloure la classificació de Soloway et al. Aquesta gradació s'especifica en la taula 8. Addicionalment, aquesta publicació indica que els pacients en grau IV tenen un particular mal pronòstic i probablement haurien de ser candidats a algun tractament concomitant.

Estadi	Definició
<b>EOD 0</b>	Normal o malaltia benigne
<b>EOD 1</b>	Metàstasis òssies: < 6 focus d'hipercaptació
<b>EOD 2</b>	Metàstasis òssies: 6-20 focus d'hipercaptació
<b>EOD 3</b>	Metàstasis òssies: >20 però < superscan
<b>EOD 4</b>	Superscan (75% de costelles, vèrtebres i ossos de la cintura pèlvica tenen focus d'hipercaptació)

**Taula 8.** Sistema de gradació semi quantitatiu per l'avaluació de l'extensió de metàstasi òssia segons Soloway et al [296]

## 1.2. Grup control

Un segon grup d'estudi de 84 pacients amb diagnòstic histològic de CaP sense metàstasis òssies. L'estadificació clínica dels malalts es va realitzar mitjançant l'exploració física (incloent tacte rectal) i la determinació de PSA. Únicament en els casos que mostraren un PSA >10 ng/ml o dolor ossi es realitzar gammagrafia òssia per descartar l'existència de metàstasis òssies. La tomografia axial computeritzada abdomino-pèlvica (TAC) es va practicar en pacients amb PSA > 20 ng/ml al debut.

Hem classificat els malalts en funció del risc establert segons els criteris de d'Amico, en risc baix de malaltia extraprostàtica, risc intermedi de malaltia extraprostàtica i risc alt de malaltia extraprostàtica. Per a tal classificació, hem utilitzat l'estadificació clínica, la determinació de PSA i el grau de Gleason. [297]

Variable	
Numero de pacients	84
EDAT (anys)	64 (55-68)
PSA (ng/mL)	6 (3.2-18)
Suma de GLEASON n (%)	
2-6 (baix risc de disseminació)	28 (33.3)
7 (intermedi risc de disseminació)	28 (33.3)
8-10 (alt risc de disseminació)	28 (33.3)
ESTADIATGE T clínic n (%)	
T1	52 (62.0)
T2	32 (38.0)

Variables qualitatives expressades com n (%)

Variables quantitatives expressades com mediana- rang interquartil

---

**Taula 9.** Característiques de les variables clinicopatològiques incloses en el grup control.

---

BAIX RISC	INTERMIG RISC	ALT RISC
PSA $\leq$ 10 i	PSA 10.1-20 o	PSA $\geq$ 20 o
GLEASON $\leq$ 6 i	GLEASON 7 o	GLEASON $\geq$ 8 o
ESTADI T1-2a	ESTADI T2b	ESTADI T3-4

---

**Taula 10.** Criteris de risc de d'Amico

---

## 2. MÈTODES

### 2.1 Paràmetres clinicopatològics

Les dades clíniques dels malalts foren obtingudes a través dels arxius de seguiment personalitzat del Servei d'Urologia.

Les variables analitzades foren les descrites a continuació:

1. Edat: inclosa en tots els casos. Variable quantitativa discreta en el moment de la recollida de dades.
2. Grau histològic: es va utilitzar el Grau de Gleason. Donat que els malalts amb metàstasis pertanyien a una cohort tancada de malalts i descrita en l'era prèvia a la utilització del Gleason score, els pacients foren reclassificats pel patòleg especialista (IdT). Variable qualitativa.
3. Estadi tumoral: es va utilitzar el sistema de gradació recomanat per American Joint Committee in càncer (UICC), mitjançant la classificació TNM (7a edició 2009). Variable qualitativa dicotòmica. Les categories corresponen a l'estadi tumoral.
4. PSA al diagnòstic: en mg/dL. Variable quantitativa continua en el moment de la recollida de dades.
5. Velocitat de PSA (vel-PSA) en pacients amb malaltia disseminada.

## 2.2. Tècnica de tinció immunohistoquímica amb RANKL

La molècula RANKL fou detectada mitjançant un anàlisi IHQ en mostres de teixit. Vàrem utilitzar portes amb seccions de teixit prostàtic parafinades. La inclusió en parafina es va realitzar mitjançant un processador de teixit Citradel 2000. El punt de fusió de la parafina utilitzada va ser de 58-60°C. Els blocs de teixit parafinat van ésser tallats amb un micròtom de rotació de Reichter-Jung 2035 amb un gruix de 3 micres i dipositats en un portaobjectes.

El protocol d'IHQ utilitzat es descriu a continuació.

En un primer pas s'estufen els talls de teixit parafinat s'estufen a 55-65°C durant tota la nit. A continuació s'hidraten mitjançant una incubació amb xilens (3 vegades, durant 5 minuts) i es finalitza amb una incubació amb etanol 100% → 100% → 90% → 90% → 70% → 70%. Finalment es renten els porta-objectes amb H<sub>2</sub>O destil·lada.

En un segon pas es realitza la recuperació antigènica on els teixits foren escalfats a 110 °C en tampó citrat a pH 7.3 per al desemmascaratge dels antigens. L'activitat de la peroxidasa endògena dels teixits es bloqueja utilitzant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% (durant 10 minuts). Finalment es renten els porta-objectes amb TBST1x pH7,6 (3 vegades durant 5 minuts).

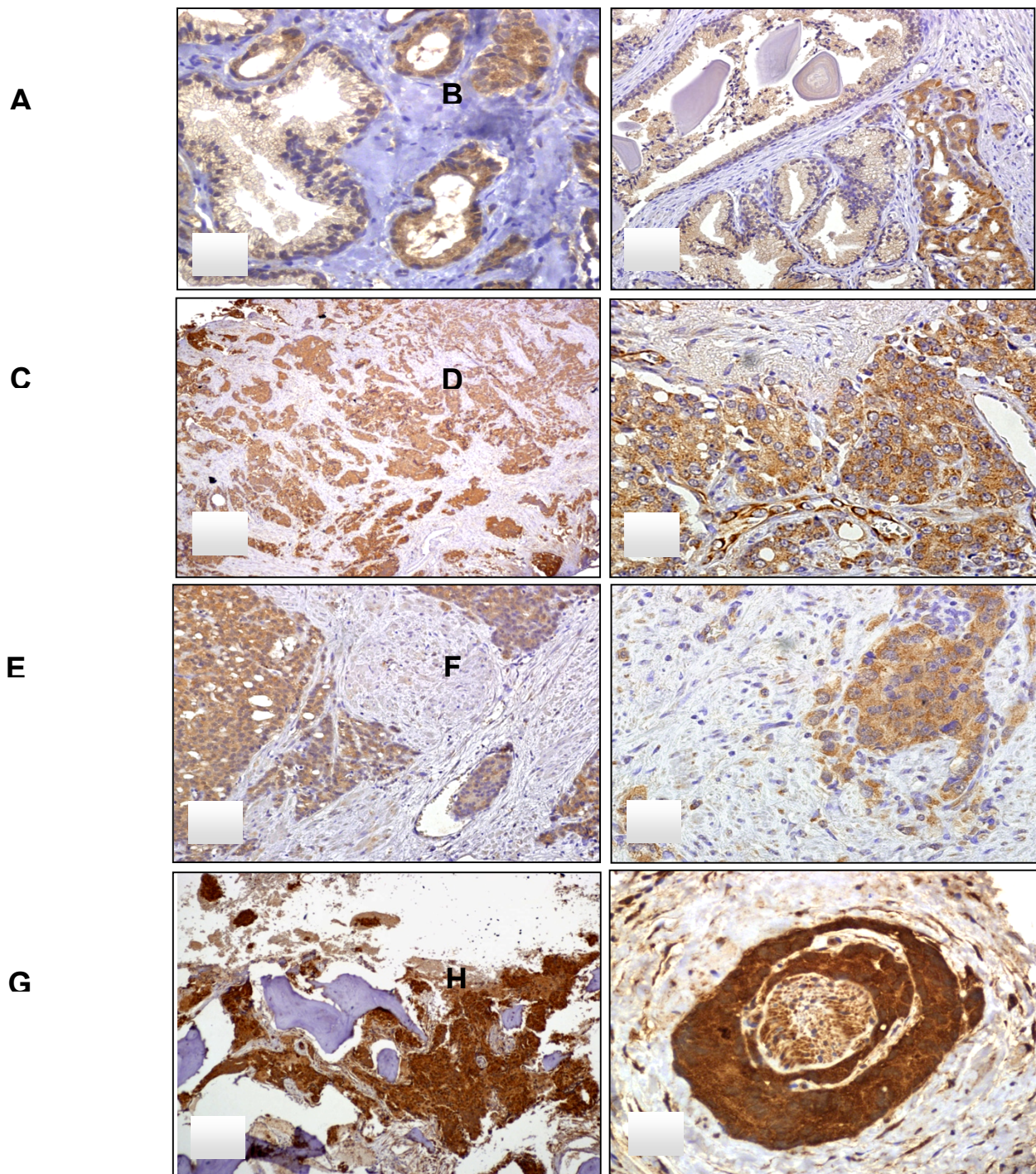
En un tercer pas les seccions de teixit foren incubades amb l'anticòs primari contra RANKL((FL-317): sc-9073 (Santa Cruz Biotechnology, INC., Santa Cruz) , per 2 hores a temperatura ambient amb una dilució 1:40. A

continuació, les seccions es netegen i s'incuben amb l'anticòs secundari HRP Rabbit/Mouse (EnVision-Dual Link System-HRP, DAKO).

En un últim pas es realitzen els rentats protocol·laris i es procedeix al revelat amb DAB (3,3-Diaminobenzidine) Chromogen (DAKO) durant 1 minut i 30 segons. Seguidament es procedeix a la contra tinció amb hematoxilina. Deshidratació de les mostres amb etanol 70% → 70% → 90% → 90% → 100% → 100% i xilens (3 vegades, durant 5 minuts) i finalment, el muntatge en un medi orgànic per a procedir a l'anàlisi.

Vam utilitzar com a control positiu en tots els experiments cartílag humà en creixement i com a control intern negatiu la glàndula prostàtica benigne.

A continuació es detallen algunes imatges gràfiques de les tincions obtingudes amb l'anticòs contra RANKL.



**Figura 7.** Mostres a diferents augments i localitzacions dels resultats de tincions obtinguts amb la IHQ. A i B. Línia de tinció diferencial entre glàndula prostàtica normal i tumoral (x200 – x400).C. Mostra de cilindre prostàtic Gleason 9 (x100).D. Zona de transició entre HBP i CaP. E. Biòpsia amb



mostra per la positivitat en la proliferació limfàtica tumoral. F. Front d'invasió tumoral per CaP. G. Biòpsia de moll d'os. H. Invasió perineural pel CaP.

---

La valoració IHQ de la tinció de RANKL es va realitzar mitjançant un mètode semi quantitatiu, valorant en cada cas l'extensió (percentatge de cèl·lules tenyides) i intensitat (0+ absent, 1+ dèbil, 2+ moderada, 3+ marcada) d'immunotinció.

Per tal de disminuir la subjectivitat de la valoració es va utilitzar un *score* histològic obtingut al aplicar la següent fórmula

$$\mathbf{HSCORE = 1x(\%dèbil)+2x(\%moderat)+3x(\%intens)}$$

Amb tot això s'obté un *score* que varia de 0 (immunoexpressió nul·la) a 300 (màxima immunoexpressió).

Aquest mètode de valoració immunohistoquímica ha demostrat una bona correlació amb els assajos bioquímics estàndards que utilitzen teixits en fresc homogeneïtzats per a la valoració i quantificació del grau d'expressió de receptors d'estrògens en càncer de mama [298, 299]. A més, la utilització de Hscore ha demostrat una gran reproductibilitat entre observadors. [300-302]

Totes les mostres s'analitzaren en la zona de tinció tumoral i en cas d'existència de HGPIIN a la mostra també s'avaluà segons l'escala semiquantitativa abans mencionada. Concomitantment s'avaluà la presència a les mostres de contornejat nuclear.

Les mostres foren analitzades al microscopi òptic (Olympus CH2 CWHK 10x18L) un augment de x 4 per a la identificació dels camps i fins a 400 per a la identificació correcta de la localització de la tinció.

La lectura fou realitzada pe l'investigador principal de l'estudi a simple cec. Els resultats varen ser validats pel Servei Anatomia Patològica Hospital Vall d'Hebron (IdT).

Finalment, l'expressió IHQ es va calibrar d'acord amb el nivell de tall resulta de l'anàlisi de la corba ROC.

### **2.3. Tècnica de detecció de l'anticòs RANKL amb immunoassaig (western blot)**

Es van utilitzar els següents cultius de línies cel·lulars per tal d'estudiar l'especificitat de l'anticòs RANKL utilitzat:

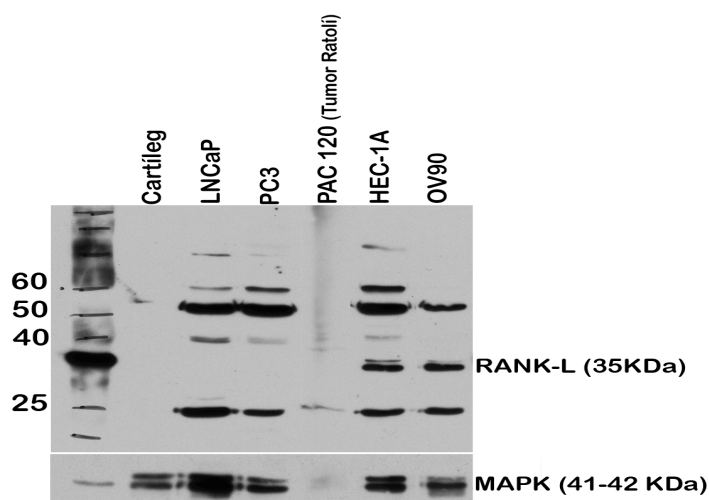
- Línies cel·lulars de CaP humana (LNCaP i PC3)
- Línies cel·lulars de carcinoma endometrial (Hec1A) i ovari (OV90)
- Línies cel·lulars de cartílag

Les cèl·lules foren incubades en el medi RPMI (Roswell Park Memorial Institute) desenvolupat en el centre mencionat per les línies de CaP, McCoy's 5A per la línia Hec1A i MCDB105:M199 (1:1), per la línia OV90. Tots suplementats amb sèrum fetal boví al 10%.

La tècnica del Western-blot es descriu a continuació:

Lisat de proteïnes procedents de teixit; tumor PCa120 (mostra de tumor de ratolí) i cartílag (com a mostra control) tal com fou descrit per Monge et al [303]. El lisat de les proteïnes obtingudes de les línies cel·lulars foren obtinguts amb rascat amb buffer RIPA (Tris 20mM pH8.8, NaCl 150mM, EDTA 5mM, Tritó X-100 1%, inhibidors de proteasa). Després d'una incubació d'una hora a 4°C les mostres es van sunicar i seguidament es van

centrifugar a màxima velocitat durant 45 minuts, el sobrenedant (on trobem el contingut proteic de les mostres) es va quantificar mitjançant un assaig de Bradford (BioRad). 80 ug de cada mostra es van incubar durant 5 minuts amb buffer Laemmli i seguidament foren separats en gels 10% SDS-PAGE, transferits a una membrana PVDF (BioRad) i incubat amb l'anticòs primari tota la nit a 4 graus C (1:2000 mAb a-RANKL, Santa Cruz i MAPK (cell signalling), com a control de càrrega). Seguidament es va procedir a la incubació de la membrana amb l'anticòs secundari (1:2000 rAb a-Mapk, Cell Signalling) durant una hora a temperatura ambient. Les proteïnes es van identificar amb immunoglobulines goat anti-rabbit HRP i rabbit anti-mouse HRP (DAKO) respectivament, i el Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat (Millipore).



**Figura 8.** Western Blot amb l'anticòs utilitzat per la tinció IHQ. Cartílag (control negatiu) LNCaP i PC3 (són línies cel·lulars de CaP) PAC120 (mostra de tumor de CaP de ratolí), HEC-1A i OV90 (son línies cel·lulars de càncer d'endometri i d'ovari, respectivament) .

## 2.4. Anàlisi estadístic

Inicialment vàrem incloure tota la informació referent a les variables en una base de dades utilitzant el programa informàtic Access. Un cop depurada la base de dades, vàrem realitzar l'anàlisi de les dades amb el paquet estadístic SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)13.0.

Per a descriure les variables quantitatives hem utilitzat la mitja i/o la mitjana amb un interval de confiança del 95%, i com a mesures de dispersió la desviació estàndard i rang. Per a descriure les variables qualitatives hem utilitzat els percentatges.

La prova de Chi-quadrat i la seva variant, prova exacta de Fisher, s'han utilitzat per relacionar les variables qualitatives; mentre que el test no paramètric de U de Mann Whitney s'ha utilitzat per comparar variables quantitatives en 2 grups.

Per a l'anàlisi dels factors predictors de progressió es va utilitzar la regressió logística binaria en les variables dicotòmiques i la regressió logística de Cox en la predicció de supervivència. La corba ROC va ser utilitzada per a establir el nivell de tall de la tinció IHQ de RANKL. La supervivència es va analitzar amb les corbes de Kaplan-Meier.

Es va considerar que existien diferències estadísticament significatives quan  $p < 0.05$  .

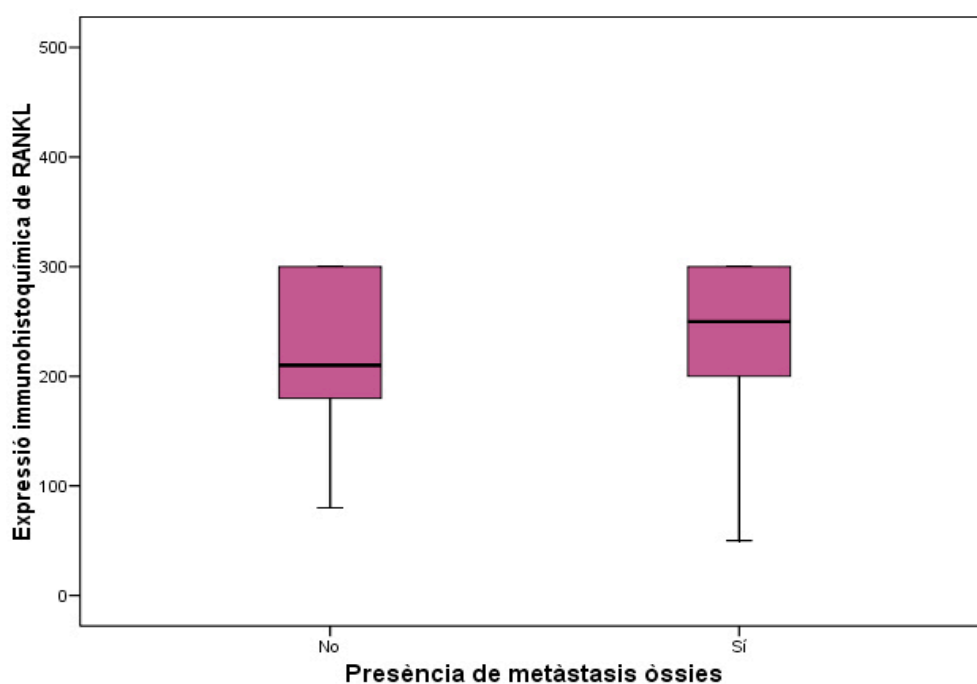
## RESULTATS

---

## 1. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ IHQ DE RANKL SEGONS L'EXISTÈNCIA DE METÀSTASIS ÒSSIES

En tots els CaP valorats a l'estudi amb diferents graus de diferenciació es va evidenciar cert grau d'immunopositivitat per a l'expressió de RANKL. En el grup de pacients amb CaP no metastàtic, la mitjana va ser de 222.1 (rang entre 208.1 i 236.1). En el grup de pacients amb CaP metastàtic, la mitjana va ser de 241.5 (rang entre 227.6 i 255.3).  $P=0.031$

En el següent diagrama de caixes s'evidencien les diferències:



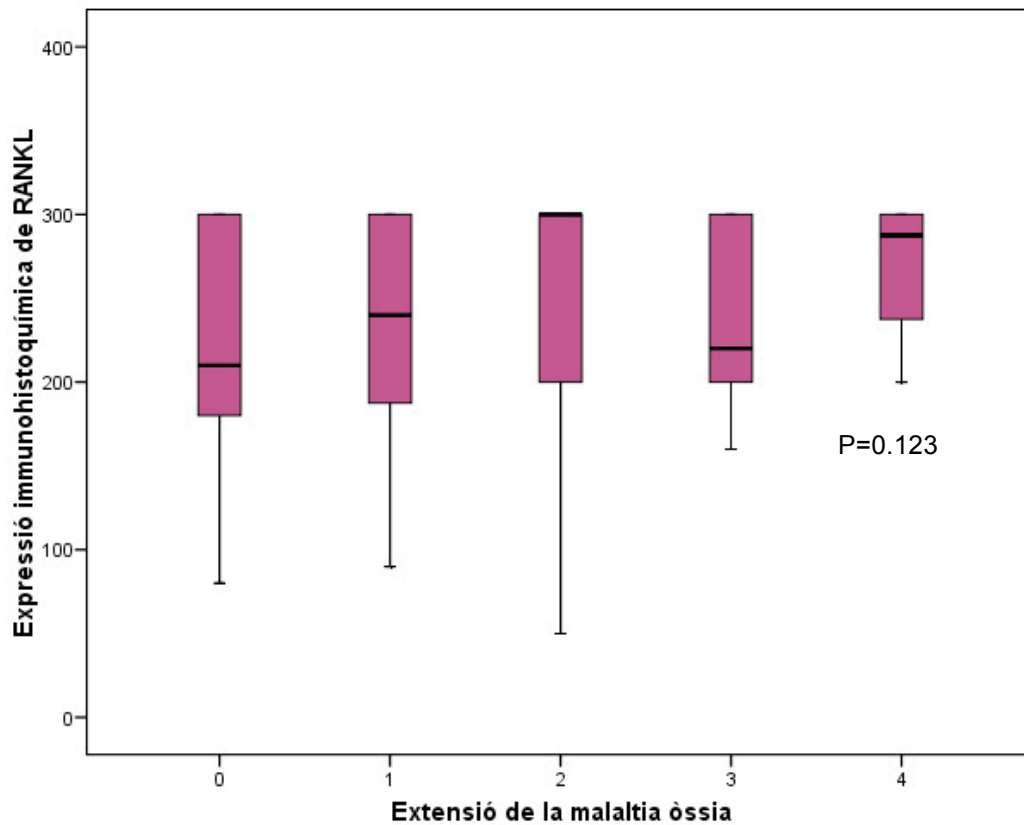
**Figura 9.** Anàlisi d'expressió comparatiu entre l'expressió IHQ de RANKL en malalts amb CaP metastàtic i no metastàtic.

Les diferències entre l'expressió de RANKL en els pacients amb CaP i metàstasis (ganglionars i/o òssies) i CaP sense metàstasis foren globalment significatives ( $p = 0.031$ ).

A l'estudi al microscòpic òptic de la tinció de RANKL evidenciem un tinció més aviat citoplasmàtica difusa, tot i que en algunes tincions es pot observar una vora nuclear carismàtica. Aquest marcatge nuclear pot ésser resultat de la translocació de la cascada de proteïnes que activa la interacció de RANK amb RANKL i per tant de la seva mobilització. Tot i això, aquest concepte és difícil d'analitzar amb la tècnica utilitzada. No s'observaren diferències en el grau d'intensitat de tinció pel que fa al front d'avenç tumoral o al propi tumor.

## **2. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ IHQ DE RANKL SEGONS L'EXTENSIÓ DE LA MALALTIA ÒSSIA**

A l'anàlisi de l'expressió IHQ de RANKL en funció de la quantitat de malaltia òssia detectada s'evidencia una tendència a una major expressió de la proteïna a mesura que es detecta més CaP a nivell ossi. Així doncs, en el cas de malalts amb malaltia òssia grau 0, l'expressió IHQ de RANKL fou de 222.1 (208.1 – 236.1). Per al grau de malaltia òssia 1, l'expressió de RANKL fou de 229.8 (205.4 – 254.3). Per al grau de malaltia òssia 2, l'expressió fou de 250.2 (222.2 – 278.2), per al grau de malaltia òssia 3, l'expressió de RANKL fou de 243.3 (220.4 – 266.2). Finalment, per al màxim grau de malaltia òssia tipus 4 l'anomenat super-scan, l'expressió de RANKL fou de 268.7 (193.4 – 300.00).



---

**Figura 10.** Anàlisi d'expressió IHQ de RANKL en funció de l'extensió de malaltia òssia.

---

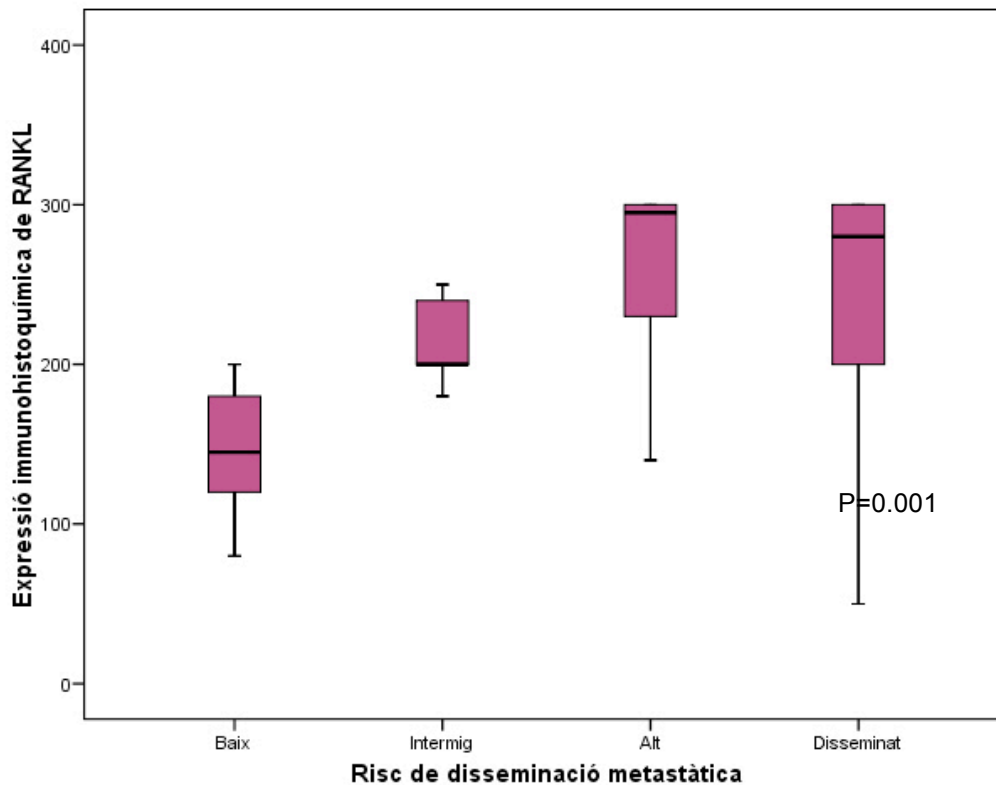
A l'anàlisi estadístic de les diferències d'expressió entre RANKL i el grau de malaltia òssia no es varen trobar diferències estadísticament significatives ( $p=0.123$ ) entre ambdós grups.



### **3. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ IHQ DE RANKL EN FUNCIÓ DE LA CLASSIFICACIÓ DE RISCS**

A l'anàlisi de l'expressió de RANKL en funció del risc observem una tendència ascendent d'expressió a mesura que augmenta el risc de disseminació (baix, intermedi, alt) i una menor expressió en el cas dels malalts disseminats. D'acord amb aquesta tendència, els pacients amb CaP i baix risc de disseminació presentaren una expressió de RANKL de 143.8 (130.3 – 157.3). Els pacients amb risc de disseminació intermedi mostraren una expressió de 204.5 (187.0 – 221.9). Els pacients amb alt risc de disseminació mostraren una expressió de 266.8 (251.6 – 281.9). Contràriament a la tendència esperada, els malalts amb malaltia òssia ja disseminada presentaren una expressió de 247.1 (234.1 – 260.1)

P=0.211 \*



\* p corresponent a la relació entre alt risc de disseminació metastàtica i pacients ja disseminats.

---

**Figura 11.** Anàlisi de l'expressió IHQ de RANKL en funció del risc de disseminació metastàtica i amb pacients amb CaP metastàtic.

---

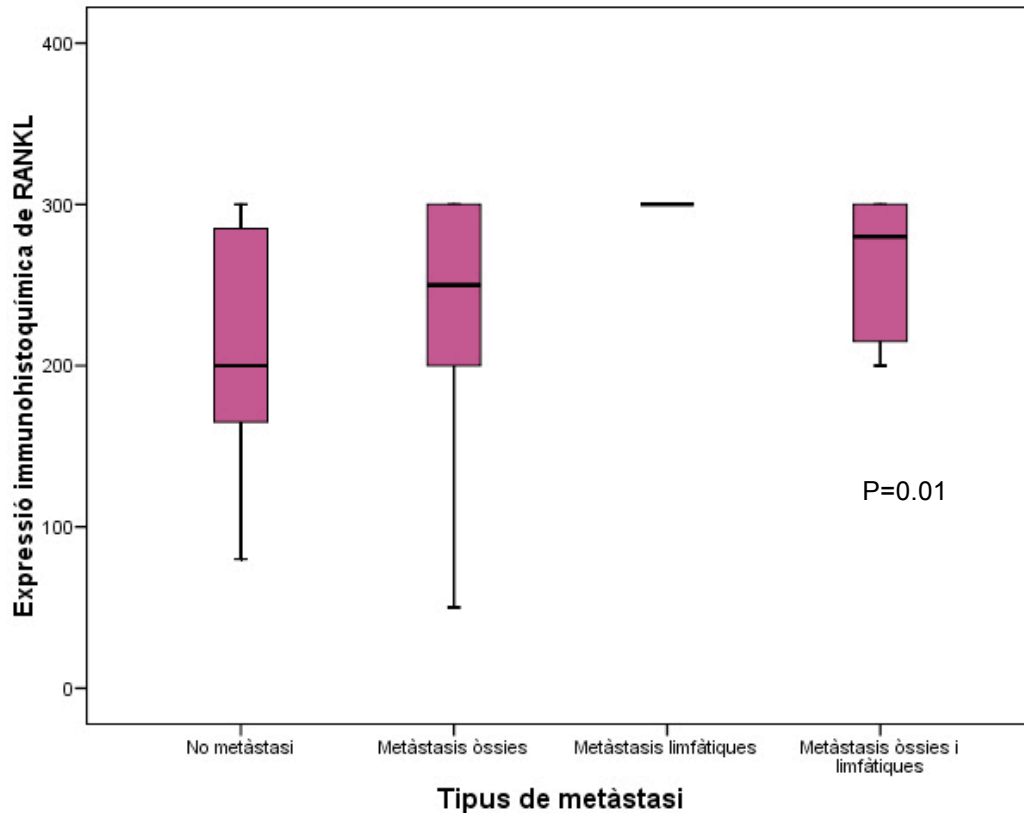
A l'anàlisi estadístic s'observen diferències estadísticament significatives pel que fa a l'expressió de RANKL i els pacients amb baix risc i risc intermedi de disseminació. També s'observaren diferències estadísticament significatives en la comparativa de pacients amb risc intermedi i risc alt de disseminació ( $p=0.001$ ). No s'observaren diferències estadísticament significatives entre l'expressió de RANKL als tumors d'alt risc

de disseminació metastàtica i aquells pacients amb tumors ja disseminats ( $p = 0.211$ ).

#### **4. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ IHQ DE RANKL SEGONS EL TIPUS DE METÀSTASI**

A l'anàlisi de l'expressió IHQ de RANKL en funció del tipus de metastasi s'observa una clara diferència entre els malalts amb sense metastasis i la resta de pacients metastàtics.

Els malalts no metastàtics mostraren una expressió de 213.9 (199.4 – 228.4). Els malalts amb metastasis òssies mostraren una expressió de 238.0 (221.9 – 254.1). Els malalts amb metastasis únicament limfàtiques mostraren una expressió màxima de 298.8 ( 296.3 – 301.4). A l'anàlisi de pacients amb metastasis òssies i limfàtiques l'expressió fou de 257.3 (232.2 – 292.5).




---

**Figura 12.** Anàlisi de l'expressió IHQ de RANKL en funció del tipus de metàstasi

---

A l'estudi estadístic s'objectiven diferències estadísticament significatives a la comparativa entre aquell grup de pacients que no presenta metàstasi i aquells que en presenten de limfàtiques i òssies al mateix temps ( $p= 0.0001$ ). També s'observaren diferències estadísticament significatives entre aquells pacients que presenten metàstasi òssies únicament i aquells que presenten metàstasi limfàtiques i òssies ( $p=0.012$ ).

Adicionalment, mostraren diferències estadísticament significatives els casos amb metàstasis òssies únicament i metàstasis limfàtiques únicament ( $p=0.004$ ), així com a la comparativa de pacients amb metàstasis limfàtiques únicament i metàstasis limfàtiques i òssies ( $p=0.026$ ).

## **5. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ IHQ DE RANKL COM A PREDICTOR DE METÀSTASIS ÒSSIES**

A l'anàlisi estadístic s'hi van introduir les següents variables: edat (en anys), xifra de PSA (ng/mL), suma de Gleason, expressió IHQ de RANKL (0-300).

A l'estudi multivariant, la regressió logística va demostrar que tan el PSA com la suma de Gleason tenen un valor com a factors predictors de metàstasis òssies, amb una raó de riscos de 0.0, 0.19. Per contra, l'expressió de RANKL no va demostrar ésser predictora de metàstasis òssies amb una significació estadística de 0.146. La odds ratio per a PSA i suma de Gleason fou de 1.028 (1.016 – 1.040) i 2.796 (1.187 – 6.587) respectivament, per a l'expressió de RANKL fou de 0.993 (0.985 – 1.002). Els intervals de confiança 95% foren els que es mostren a la taula següent.

Variable	Odds ratio (95% IC)	Valor p
Edat	1.014 (0.957-1.075)	0.637
PSA	1.028 (1.016-1.040)	0.000
Suma de Gleason	2.796 (1.187-6.587)	0.019
RANKL	0.993 (0.985-1.002)	0.146

---

**Taula 11.** Anàlisi multivariant per a factors predictors de metàstasi òssia.

---

## 6. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ IHQ DE RANKL COM A MARCADOR DE DISSEMINACIÓ METASTÀTICA GLOBAL

Com a resultat de l'absència de significació de RANKL com a predictor de metàstasis òssies, vàrem analitzar les dades tenint en compte tots els tipus de disseminació reflectits.

A l'estudi multivariant, la regressió logística va demostrar que PSA i RANKL tenen valor com a factors predictors de metàstasis limfàtiques amb una raó de riscos 0.03 i 0.01, respectivament. La suma de Gleason no va demostrar tenir rellevància en la predicció de metàstasis limfàtiques amb una significació estadística de 0.508. La odds ratio per a PSA i suma de Gleason fou de 1.001 (1.000 – 1.001) i 1.309 (0.509 – 2.903), respectivament. L'expressió de RANKL mostra una odds ratio de 1.013 (1.003 – 1.024).

Variable	Odds Ratio (95% IC)	Valor p
Edat	0.961 (0.912-1.013)	0.140
PSA	1.001 (1.000-1.0001)	0.030
Suma de Gleason	1.309 (0.590-2.903)	0.508
RANKL	1.013 (1.003-1.024)	0.013

---

**Taula 12.** Anàlisi multivariant per a factors predictors de metàstasi global.

---

## 7. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ IHQ DE RANKL COM A MARCADOR DE DISSEMINACIÓ METASTÀTICA LIMFÀTICA

A l'estudi multivariant, l'estudi de regressió logística no va demostrar que PSA, suma de Gleason ni RANKL fossin factors predictors de metàstasi global en el càncer de pròstata amb una significació estadística de 0.000, 0.134, 0.874 respectivament. Les odds ratio per a PSA, suma de Gleason i RANKL foren respectivament de 1.098 (1.057 – 1.140), 2.129 (0.792 – 5.726), 1.001 (0.988 – 1.014).

Variable	Odds Ratio (95% IC)	Valor p
Edat	1.034 (0.959-1.115)	0.386
PSA	1.098 (1.057-1.140)	0.000
Suma de Gleason	2.129 (0.792-5.726)	0.134
RANKL	1.001 (0.988-1.014)	0.874

---

**Taula 13.** Anàlisi multivariant per a factors predictors de metàstasis limfàtiques.

---

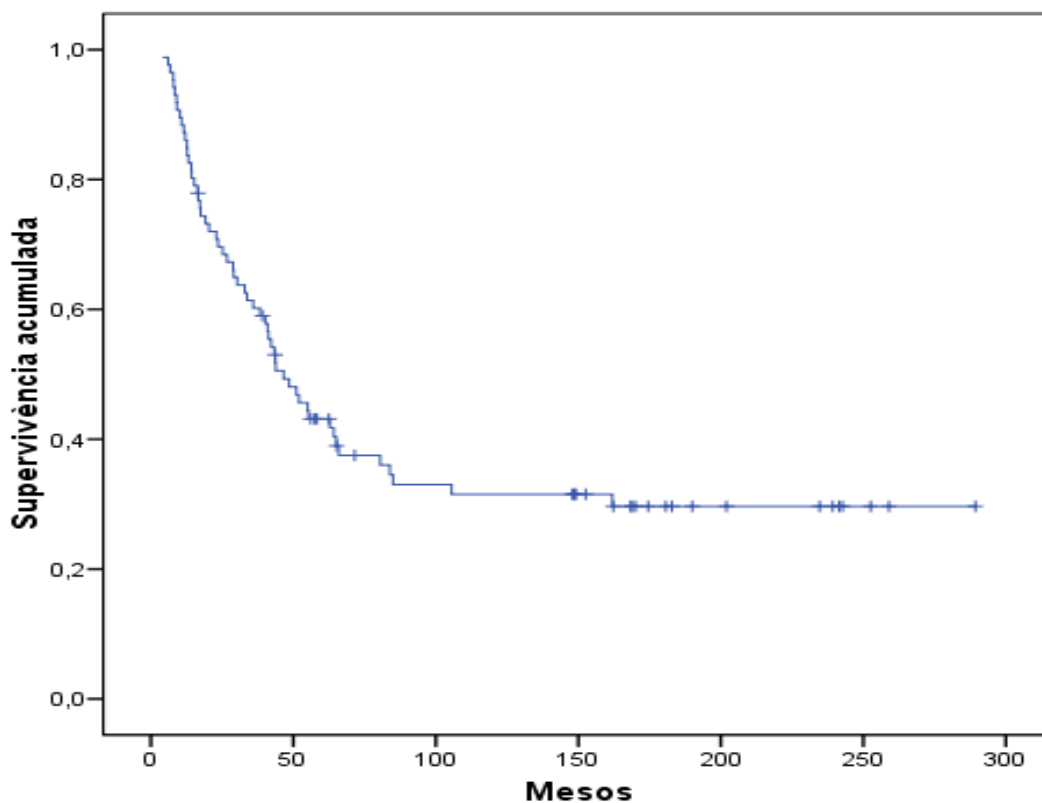
## 8. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE RANKL COM A MARCADOR DE SUPERVIVÈNCIA

A l'anàlisi de supervivència dels pacients disseminats s'observaren els següents resultats.

La supervivència càncer-específica dels CaP metastàtics va ser de 112.45 mesos de mediana (IC 95% 86.3 – 138.5).

La supervivència mitjana dels malalts es de 46.5 mesos (IC 95% 33.3 – 59.8), es a dir el 50% dels malalts als 46 mesos son èxits en el context del nostre estudi.





**Figura 13.** Anàlisi de supervivència global en pacients amb CaP

A l'estudi de regressió de Cox objectivem que cap de les variables observades a l'estudi (Edat, Gleason, PSA, MOD, RANKL) funcionen com a predictores de risc per a la progressió del CaP.

Al mètode Introducció, per a l'anàlisi de la supervivència, s'evidencia que la variable MOD (malaltia òssia disseminada) dicotomitzada a menys o mes de 6 acúmuls, mostra una significació pronòstica de supervivència en el cas malalts amb menys de 6 acúmuls a la gammagrafia òssia (0.009). La odds ratio per aquesta variable es de 2.36 (IC 95% 1.23 – 4.526). El mateix efecte es dona al analitzar la variable velocitat de PSA postnadir (ng/ml), és a

dir, un cop els pacients amb CaP ja són resistents a la castració. Aquesta variable demostra significació pronòstica de supervivència de 0.018. La odds ratio d'aquesta variable es de 0.994 (IC95% 0.990 – 0.999).

Variable	Odds Ratio (95% IC)	Valor p
Suma de Gleason	1.077 (0.858-1.352)	0.522
PSA	1.001 (0.998-1.005)	0.483
EOD	2.366 (1.237-4.526)	0.009
Vel PSA post *	0.994 (0.990-0.999)	0.018
RANKL	0.999 (0.994-1.004)	0.751

\* velocitat de PSA post-progressió bioquímica (estatus resistent a la castració).

---

**Taula 14.** Anàlisi de regressió logística de Cox per a factors pronòstics de supervivència.

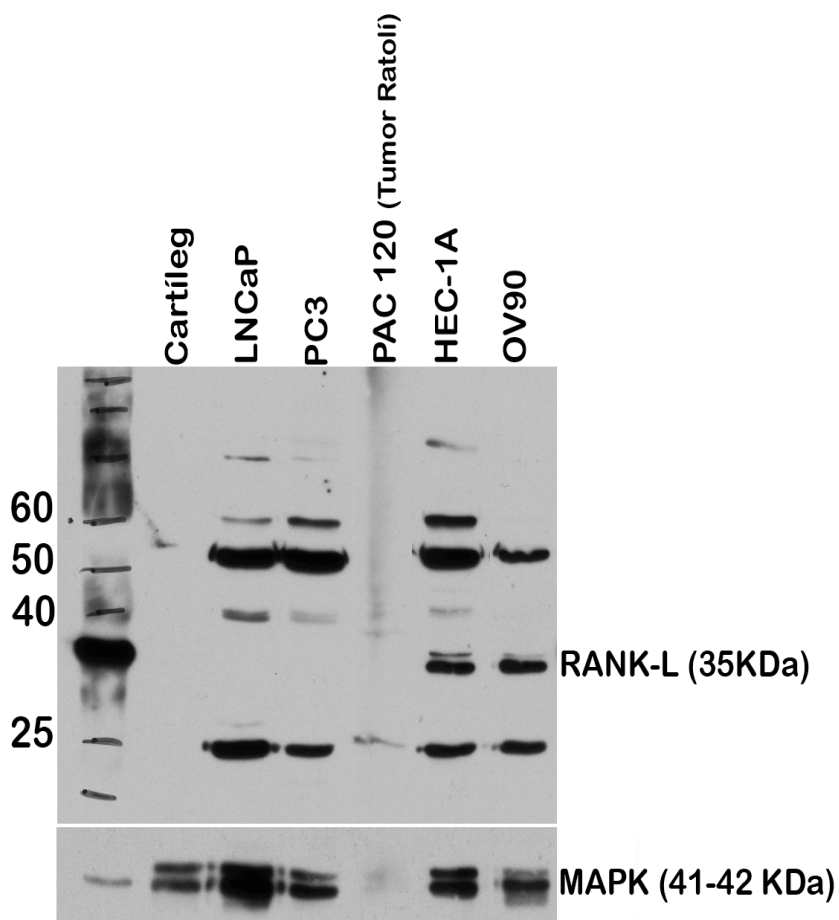
---

## 9. ANALISI DE L'ANTICÒS UTILITZAT PER MÈTODE WESTERN BLOT

Donats els resultats obtinguts desconcertants a l'estudi estadístic vàrem decidir analitzar l'anticòs.

Per tal d'evidenciar l'especificitat de l'anticòs utilitzat vam analitzar l'expressió proteica de RANKL en diferents línies cel·lulars de CaP, així com en cartílag. A la figura 8 veiem a l'esquerre la columna corresponent als pesos moleculars, a la base de la figura s'objectiva la proteïna MAPK que

vam utilitzar per a mostrar la càrrega de proteïna corresponent a cada mostra, La molècula RANK-L té un pes molecular d'aproximadament 35 KDa, així doncs hauríem d'evidenciar una única banda entre el tram dels 25 i 40 KDa com a mínim en la mostra de cartílag (control positiu) així com en la línia cel·lular PC3. A l'estudi de la proteïna RANKL amb l'anticòs facilitat per la casa comercial que vam utilitzar s'evidencia la poca especificitat de l'anticòs en qüestió. L'anticòs comercial RANKL utilitzat s'adhereix a varies proteïnes presents en el supranadant, és a dir, evidenciem varies bandes en les diferents mostres que demostren la poca especificitat que té aquest anticòs per la molècula RANKL.



---

**Figura 8.** Estudi amb Western Blot sobre la proteïna RANKL.

LNCaP: Human prostate adenocarcinoma cell line from lymph node metastatic site

PC3: Human prostate adenocarcinoma cell line from bone metastatic site

PAC120: Human prostate adenocarcinoma generated in PAC120 mouse

mode Hec1A: Human endometrial carcinoma cell line

TOV112: Human one clear-cell ovarian carcinoma cell line

OV90: Human malignant papillary serous ovarian adenocarcinoma cell line from ascities metastatic side

---

## DISCUSSIÓ

---

El CaP suposa el tumor més freqüent en homes majors de 50 anys (excloent el càncer de pell) i les metàstasis òssies determinen la morbimortalitat associada. Tot i la detecció precoç gràcies a la introducció de la mesura del PSA com a mètode de cribratge, encara se'ns fa difícil als uròlegs de caracteritzar-ne l'agressivitat, és a dir, de determinar aquells malalts que es beneficiaran d'un tractament multidisciplinari.

La major font de morbiditat i mortalitat en el CaP és dona per (l'afectació òssia a distància) resultat del tropisme de les cèl·lules de CaP per l'os. Aquest és un fenomen anomenat *osteotropisme* [304]. En els malalts amb CaP i tractament amb SA on s'observa progressió de la malaltia, de fet el 80% presenten metàstasis a l'os [305]. Les metàstasis òssies alteren la composició normal de l'os i generen un desequilibri en el cicle vital de l'os, envaint les estructures veïnes i generant complicacions com són les fractures patològiques, compressió medul·lar i l'anèmia per infiltració del moll d'os. Aquestes complicacions són les anomenades ERE (*esdeveniments relacionats amb l'esquelet*).

En el CaP les metàstasis òssies i el ERE es donen en un entorn bàsicament osteopènic, ja que la SA ha estat durant les últimes dècades, el tractament primari en molts d'aquests malalts. El dèficit constant de testosterona, degut a la supressió androgènica, genera una pèrdua constant de massa òssia. La interacció entre l'osteotropisme selectiu del CaP i l'important alteració en l'equilibri ossi creen una situació única no present en altres tipus de neoplàsies, difícil d'estudiar, anomenada el "paradigma ossi" del CaP.

En l'os normal i sa, la formació i resorció òssia es donen en una seqüència equilibrada gràcies a les dues cèl·lules clau en aquest procés, els osteoclasts i osteoblasts. Els osteoclasts són responsables de la resorció òssia, mentre que els osteoblasts s'encarreguen de la formació d'os. Ambdues cèl·lules es comuniquen entre elles a través de factors paracrins locals. La molècula RANK (receptor activator of nuclear factor-kB) i RANKL (receptor activator of nuclear factor-kB ligand) juguen un paper clau en aquest procés de comunicació. La unió de RANKL amb RANK comporta la maduració dels pre-osteoclasts a osteoclasts madurs, alliberant-se TGF- $\beta$  al produir-se la resorció òssia, que al mateix temps estimula la formació d'osteoblasts [223]. La degradació d'os induïda pels osteoclasts també genera la degradació de la matriu col·làgena de l'os pel que s'alliberen al mateix temps proteïnes de degradació com la uNTX (N-telopeptid urinari) que son les que podem mesurar en sang o orina [291].

Varies hormones, citoquines i factors de creixement poden estimular l'expressió de RANKL per part dels osteoblasts. Per tal d'aconseguir mantenir la formació i la degradació en equilibri, els osteoblasts i les cèl·lules de l'estroma produeixen osteoprotegerina (OPG) que actua com un factor inhibidor impedit la unió de RANK amb RANKL i estimulant els osteoclasts a entrar en apoptosi. Un desequilibri de la ratio RANKL/OPG comporta un paper clau en la majoria de patologies de l'os.

Determinats factors en els càncer metastàtics tenen un efecte dual en el tàndem RANKL-OPG. De fet, PTHrp, IL-1 i PGE2 actuen a nivell de l'estroma ossi i estimulen l'activitat osteoclàstica incrementant RANKL i reduint OPG de forma simultània [306]. Els limfòcits T (incloent CD8 i CD4)

son probablement una altra font de RANKL en el context de les metàstasis òssies. De fet, en les cèl·lules de mieloma múltiple s'evidencia un increment de la producció de RANKL per part dels limfòcits T [307], tot i que una evidència funcional de la interacció entre RANKL –càncer – metàstasi òssia no es va poder demostrar.

L'expressió de RANKL s'ha descrit en alguns tipus de càncer com el de mama, pròstata, mieloma múltiple i tumors renals. De fet, increments en l'expressió de RANKL s'han demostrat en línies cel·lulars de CaP després del tractament amb TGF- $\beta$  [308]. Paral·lelament a aquesta hipòtesi que el RANKL produït per les cèl·lules tumorals accelera la formació d'osteoclasts i les metàstasis òssies, trobem a la literatura cites en relació a l'elevada expressió de RANKL en tumors primaris de ronyó. Aquesta sobreexpressió s'associa amb una reducció del temps lliure de metàstasi òssia [309]. El mateix concepte s'ha descrit en el context del hepatocarcinoma [310].

Actualment, cap estudi correlaciona clarament els nivells de RANKL en sèrum amb les metàstasis òssies. Això es degut probablement al fet que desconecem concretament les diferents formes d'expressió de la proteïna (soluble, unida a membrana...), o bé als baixos nivells presents en sang que són per tant, tècnicament difícils de detectar [311]. Una altra possibilitat és que els increments en RANKL es donin únicament de forma local a l'os [312]. Per tal d'entendre millor l'activitat prometastàtica de RANKL, varis investigadors han intentat determinar els patrons d'expressió d'aquest trio molecular en línies cel·lulars. Quan tractem línies cel·lulars in vitro amb RANKL s'observa una sobreexpressió de la proteïna RANK a la superfície de les línies cel·lulars de CaP, càncer de mama, osteosarcoma, melanoma i



pulmó. A més a més, l'administració de RANKL a les diferents línies cel·lulars ha demostrat induir una varietat de factors potencialment involucrats en la migració, angiogènesi i invasió (MMP1, MMP9, EMMPRIN/CD47, ICAM-1, IL-6, IL-8, VEGF) [313] que contribueixen a l'increment de RANKL que s'evidencia en les metàstasis a distància *in vivo*.

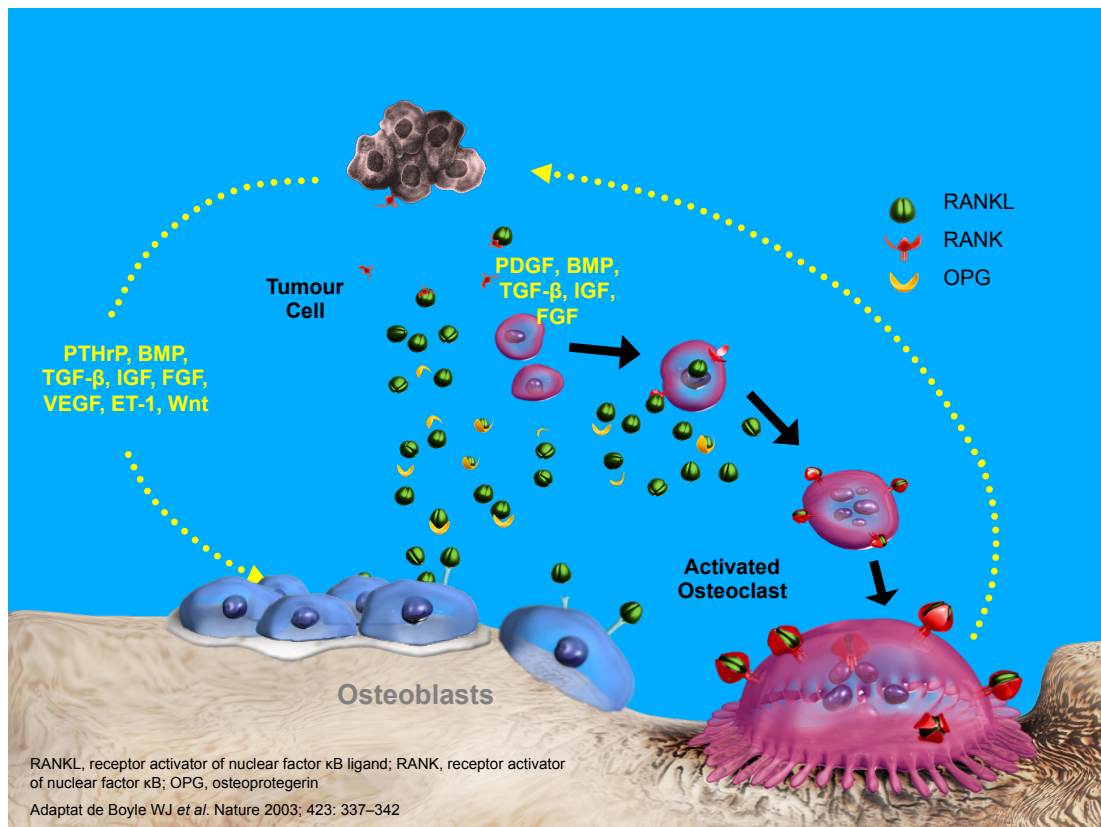
En general, RANKL es troba sobreexpressat en teixit normal a les localitzacions metastàtiques, incloent el ganglis limfàtics i l'os [223]. L'expressió de RANK en línies cel·lulars tumorals no es requereix estrictament perquè es donin les metàstasis òssies en els models experimentals. Tot i això, 2 estudis *in vivo* recolzen el fet que la font de RANKL en les metàstasis òssies és el propi os en el tumors que expressen per si mateixos RANK. Jones et al [241] descriuen que les cèl·lules tumorals albergades a l'os deixen d'expressar RANK quan s'administra un inhibidor de RANKL. Tometsko et al [314] descriuen un increment en el creixement de les cèl·lules tumorals a l'entorn ossi si s'evidencia un increment en l'expressió de RANK (en comparació amb les cèl·lules tumorals amb baixos nivells de RANK).

El camí de transducció de senyals de RANKL té un paper crític en el tropisme selectiu de les cèl·lules del CaP per l'os. És doncs la molècula candidata per atreure les cèl·lules del CaP i fer-les viure en l'ambient de l'os. [315].

Les cèl·lules tumorals amb gran tropisme per l'os, secreten PTHrP (hormona paratiroidea like), que incrementa l'activitat de RANKL mitjançada pels osteoclasts donant lloc a les metàstasis osteolítiques. Al alliberar-se mes TGF $\beta$  directament es facilita el creixement de les cèl·lules tumorals creant un

“cercle viciós” retro alimentat. Aquests mecanisme es típic de les cèl·lules del càncer de mama i es troba àmpliament descrit. [316] En la figura 15 es descriuen les interaccions entre les diferents molècules.

Per contra, les cèl·lules del CaP secreten factors de creixement com la endotelina 1 (ET-1) i les proteïnes morfogenètiques de l'os (BMP) que selectivament estimulen la proliferació osteoblàstica. Hipotèticament, el fenotip osteoblàstic es resultat també de la secreció d'altres proteases, entre elles el PSA, que inactiven la PTHrp i altres factors pro-osteoclastics.



**Figura 14.** Diagrama d'interaccions entre les cèl·lules tumorals-osteoclasts-osteoblasts.

Donat el potencial de RANKL com a diana terapèutica per la destrucció òssia mitjançada pels osteoclasts, varis estudis avui en dia intenten trobar-hi la utilitat. Denosumab és un anticòs monoclonal humà tipus IgG2 que específicament inhibeix RANKL fent doncs un efecte similar a la osteoprotegerina [316].

Hi ha estudis ja publicats que van començar demostrant la seva eficàcia davant dels bifosfonats en el tractament de les patologies òssies.

Els primers estudis fase I van demostrar una reducció en la resorció òssia (a través de la mesura de marcadors de remodelació òssia com uNTX) a l'administració subcutània de l'anticòs en dosi ascendent en pacients amb càncer de mama i mieloma múltiple. En comparació amb l'administració endovenosa de bifosfonats (pamidronat 90 mg), el descens en els marcadors de remodelació òssia produït pel denosumab fou similar en magnitud però més perllongat [317, 318].

Posteriorment, els estudis fase II van avaluar la seguretat i eficàcia de diferents règims de denosumab en pacients amb càncer així com van aclarir el diferent mecanisme d'acció envers els bifosfonats (que s'uneixen a l'hidroxiapatita de la superfície mineral òssia, on inhibeixen els osteoclasts madurs de forma local). Concretament, McClung et al 2006 van observar que als 12 mesos de l'inici de l'administració semestral de denosumab subcutani s'evidenciava en dones menopàusiques amb pèrdua prèvia de massa òssia, una milloria en la DMO a les 3 localitzacions habitualment estudiades (columna lumbar, maluc i radi distal). Posteriorment, amb la mateixa cohort de pacients, Cummings et al van demostrar que l'administració de denosumab en pacients post menopàusiques amb baixa DMO prevenia

l'aparició de fractures òssies relacionades [319]. Un estudi en dones amb càncer de mama i metàstasis òssies demostra l'evidència d'una major supressió en els marcadors de remodelació òssia en pacients amb denosumab en comparació amb bifosfonats endovenosos [320]. En un segon estudi randomitzat fase II amb pacients metastàtics de càncer de mama, pròstata i altres tumors sòlids demostra que en pacient que havien mantingut uns nivells de uNTX elevats amb bisfosfonats, es donava una decrement rellevant de uNTX al administrar denosumab. De fet, el 71% dels pacient que van rebre denosumab van reduir els nivells de uNTX en comparació a només el 29% dels tractats amb denosumab [321].

Ellis et al [322] van publicar que en dones amb càncer de mama i en tractament amb inhibidors de l'aromatasa, l'administració de denosumab per 36 mesos comportava una millora notable de la DMO sense existir cap diferència en els efectes secundaris en comparació amb el placebo.

Per tant, els estudis fase II van aconseguir definir clarament l'eficàcia de denosumab en pacients amb càncer, independent del tipus de tumor i establir l'habilitat de denosumab en el control de la resorció òssia.

Els esdeveniments ossis són la principal complicació derivada de les metàstasis òssies per tumor. Per tal d'avaluar l'eficàcia de denosumab en aquest context, els estudis fase III es van realitzar en pacients amb metàstasis òssies per càncer de mama [323], CaP hormonorefractari [324] i altres tumors avançats o mieloma múltiple [325].

En l'entorn del CaP, hi ha una sèrie d'assaigs clínics fase III clau en desenvolupament clínic de la molècula denosumab. En l'actualitat tenim evidència a través d'estudis randomitzats dels tres objectius on denosumab

ha resultat esser efectiu: prevenció de la pèrdua de massa òssia, prevenció de ERE en pacients amb malaltia disseminada i resistents a castració i prevenció de disseminació òssia.

Primerament, foren Smith et al [326] que avaluaren la utilització de la molècula en el context de la prevenció de pèrdua de massa òssia. Aquest autors analitzaren 1468 pacients amb CaP no metastàtic en ADT. L'estudi dividia els pacients en 2 grups; Placebo i Denosumab (60 mg/6 mesos sc). Els resultats demostraren que en el grup que va rebre denosumab, la DMO a nivell lumbar s'incrementava significativament un 6.7 punts en comparació amb el placebo als 24 mesos (5.6% vs -1.0%;  $P \leq 0.001$ ). La DMO a nivell lumbar i del maluc (4.8%;  $P \leq 0.001$ ) també s'incrementà. A més a més, s'objectivà també una reducció en la incidència de noves fractures vertebrals als 36 mesos de tractament (1.5% en el grup en tractament amb denosumab, 3.9% per placebo). Així doncs, l'efecte del denosumab aparentment es precoç i robust. Aquest es el primer assaig on es demostra ja la reducció de noves fractures vertebrals, motiu pel que tan la FDA (Food and Drug Administration) com la EMA (European Medicine Agency) aprovaren el seu us específic en malalts amb CaP sotmesos a deprivació androgènica. Paral·lelament, Fizazi et al [321] analitzaren l'efecte de l'administració de denosumab a pacients metastàtics que havien presentat una pobre resposta al tractament estàndard amb bifosfonats. La mesura en la reducció de la reducció òssia es fa amb NTX en orina. Aquest estudi inclou malalts amb CaP i càncer de mama amb metàstasis òssies demostrades i nivells de uNTX >50 nmol/L en tractament amb bifosfonats. S'administrà de forma alternativa denosumab sc o bifosfonats endovenosos. L'administració de denosumab

redueix el procés de resorció òssia (al disminuir els nivells de NTx en orina). Estudis previs han demostrat que nivells elevats de uNTX amb pacients amb metàstasis òssies son predictors d'esdeveniments ossis, progressió per càncer i mort [327], tot i evidenciar una reducció en el nombre d'esdeveniments ossis en aquest estudi el nombre no fou suficient per demostrar evidència, tampoc es mostren resultats a llarg termini en relació a supervivència càncer específica en aquest pool de pacients.

A principis de 2011 vàrem obtenir resultats de l'estudi randomitzat a doble-cec que analitza la prevenció d'esdeveniments ossis en pacients amb CaP en ADT que no havien rebut prèviament tractament amb bifosfonats. [324]. Aquest assaig clínic compara l'efectivitat en la prevenció d'ERE entre el tractament estàndard (àcid zoledrònic) i la nova molècula. Es demostra en 1904 pacients (950 assignats a denosumab (120 mg/ 4 setmanes) i 951 assignats a rebre àcid zoledrònic) una reducció significativa en el nombre d'esdeveniments ossis en malalts amb CaP i tractament hormonal. De mediana el temps fins al primer esdeveniment ossi dins l'estudi fou de 20.7 mesos (95% IC 18.8-24.9) vs. 17.1 mesos (95% IC 15.0-19.4) amb àcid zoledrònic (HR 0.82, 95% IC 0.71-0.95). Efectes adversos seriosos foren igualment recollits en ambdós grups (63% per denosumab vs 60% per àcid zoledrònic) però un major nombre de casos d'hipocalcèmia foren detectats en el grup de denosumab (13% vs. 6%  $p < 0.0001$ ), probablement degut al diferent mecanisme d'acció en el qual ambdós tractaments funcionen. L'osteonecrosis mandibular fou infreqüent (22 [2%] vs 12 [1%];  $p = 0.09$ ).

Recentment hem obtingut els primers resultats d'un assaig clínic que intenta determinar l'últim eslavó en l'ús d'aquesta molècula del punt de vista

clínic, es a dir, la prevenció de metàstasis òssies. En pacients amb CaP hormonorefractari sense evidència de metàstasis òssies utilitza 2 grups d'estudi, denosumab (716 pacients) (120 mg/4 setmanes) i placebo (716 pacients). Presenta com a objectiu primari el temps fins a la primera metàstasi òssia o mort per una altra causa. Smith et al [295] mencionen un lleu increment en la supervivència lliure de metàstasis òssies de 4.2 mesos (denosumab mediana 29.5 IC 95% 25.4-33.3, vs placebo 25.2 IC95% 22.2-29.5). Els resultats també mostren un increment en temps fins la primera metàstasi òssia (33.2 mesos vs 29.5 mesos) estadísticament significatiu. No s'objectiven diferències en la supervivència global d'aquests pacients amb aquest tractament. Aquest es el motiu pel que la FDA no aprovà l'ús d'aquest tractament en el context de la prevenció de metàstasis. Així doncs, aquests resultats son la primera evidència clara del paper del microambient de l'os i RANKL en el desenvolupament de les metàstasis òssies en pacients amb CaP [295]. En el congrés de l'Associació Americana d'Urologia de 2012 [328] es van presentar els resultats del reanàlisi de l'estudi mencionat prèviament. Es demostra una reducció del 25% (hazard ratio 0.75 (95% IC 0.62-0.91) en l'aparició de metàstasis múltiples i simptomàtiques. La rellevància de la troballa recau en el fet que la totalitat de malalts inclosos en aquest estudi eren pacients amb alt risc de disseminació metastàtica (PSA >8 ng/mL, PSADT <10 mesos) hormonorefractaris; així doncs, denosumab aconsegueix reduir l'aparició d'aquestes metàstasis. Noves dades foren exposades al congrés de la societat americana d'oncologia mèdica [320] del 2012 [329] on el subanàlisi de la mateixa població en els malalts amb PSADT <6 mesos

demostren beneficiar-se molt més d'aquest tractament en termes de desenvolupament de metàstasis òssies.

Els primers autors en descriure l'associació en teixit de CaP entre el grau d'expressió de RANKL i l'agressivitat tumoral foren Brown et al [262]. Utilitzen un total de 28 pacients. Els seus resultats d'expressió mostren en pròstata normal que OPG i RANKL es detecten a varis nivells (5-65% estromal, 15-70% luminal per OPG; 15-50% basal, 40-90% luminal, 70-100% estromals per RANKL). RANKL es detecta en 10/11 pacients amb CaP, OPG no es detecta en teixit amb CaP. El percentatge de cèl·lules tumorals expressant OPG i RANKL es veu incrementat en tots els CaP metastàtics en comparació amb CaP sense M1 òssies o sense M1. Els autors conclouen que els malalts amb CaP i metàstasis òssies expressen més OPG i RANKL que els no metastàtics o M1 no òssies. Aquestes molècules juguen un paper en l'establiment d'aquestes metàstasis.

Posteriorment, Chen et al [244] van publicar un treball que incloïa 89 malalts amb CaP. D'aquests, 48 malalts mostraven CaP en estadi localitzat i 41 pacients un estadi disseminat (11 amb metàstasis ganglionars i 30 amb metàstasis òssies. Els autors determinares l'expressió de RANKL, RANK, OPG en línies cel·lulars i l'expressió de RANKL, RANK, OPG en teixit de CaP. Els resultats mostren una expressió de RANKL (31%), RANK (38%), OPG (19%) en tumor primari, expressió RANKL (44%), RANK (49%), OPG (73%) en metastàtics i una expressió de RANKL, RANK i OPG en teixit limfàtic i metàstasis òssies (47%, 50%, 83% respectivament). Les conclusions remarquen l'augment de l'expressió de RANKL, RANK i OPG en correlació amb el Gleason, TNM, estat androgènic, i PSA en els malalts amb



CaP. Així com una correlació de l'expressió de RANKL/RANK/OPG en CaP metàstasis, avançats i més agressius suggerint doncs un paper d'aquesta molècula en el diagnòstic, pronòstic i tractament d'aquests malalts.

Finalment, Perez-Martinez et al [330] publicaren un estudi amb 47 pacients amb CaP on es realitzen tincions de PTHrp, PTH1R, OPG, RANKL, Ki67 i CD34. Els resultats demostren un increment d'expressió OPG i RANKL en funció grau tumoral i per tant, els autors conclouen que s'evidencia una sobre expressió de RANKL en tumors d'alt grau. Per tant, la determinació RANKL podria ésser una bona eina per diferenciar els tumors d'alt i baix grau.

Aquests tres estudis descrits fins a l'actualitat exposen merament una descripció IHQ de l'expressió de RANKL en el teixit primari prostàtic sense correlacionar aquesta expressió en termes de progressió i/o supervivència global. En relació amb aquestes troballes i a l'evidència obtinguda en estudis randomitzats de l'associació entre supervivència lliure de metàstasis i denosumab, vàrem establir la nostra hipòtesi per tal de correlacionar l'expressió en teixit prostàtic amb la supervivència d'aquests malalts. El nostre estudi pretén doncs determinar la utilitat de la molècula de RANKL com a marcador pronòstic en el CaP.

Els nostres resultats demostren una major expressió de RANKL en el teixit prostàtic de malalts metastàtics. No s'evidencien diferències en els graus d'expressió de RANKL en el teixit prostàtic primari en funció del grau d'extensió de la malaltia òssia. Una similar expressió de RANKL en els malalts amb alt risc de disseminació que en malalts ja disseminats s'evidencia en la nostra cohort. Aquests resultats demostren doncs que

aquells malalts que del punt de vista clínic considerem no metastàtics però amb alt risc de disseminació, deuen presentar ja micrometastasis que passen desapercebudes a l'estadificació clínic. Es difícil d'establir clarament quina part del complex RANK-RANKL-OPG juga un paper més clau en tot aquest procés, de fet, ja al 2003 Lessard et al [331] utilitzant únicament teixit provinent de prostatectomia radical, per tant, pacients amb malaltia localitzada, fa una correlació entre la positivitat – negativitat de l'expressió de RANK i el Gleason. S'arriben a establir dues categories de risc (baix risc amb millor pronòstic en cas de RANK negatiu i Gleason 2-4; alt risc amb mal pronòstic en cas de RANK positiu i Gleason 8-10).

Pel que fa a l'expressió en els ganglis limfàtics observem expressió similar en els teixit tumoral prostàtic de malalts amb metàstasis limfàtiques que no pas en el teixit prostàtic primari de pacients amb metàstasis òssies. Tot i això aquests resultats són de difícil qualificació ja que el nombre de malalts amb metàstasis limfàtiques era força reduït en la nostra cohort.

Tal com hem descrit prèviament la molècula RANKL present en el ganglis limfàtics o altres localitzacions metastàtiques podria estimular el creixement metastàtic dels tumors RANK positiu. En la mateixa línia, Lessard et al [331] demostren en una cohort de 20 pacients amb CaP i invasió a ganglis limfàtics que per cada increment del 1% en l'expressió de RANK s'associa a un increment en el risc d'invasió dels ganglis limfàtics ( $p=0.003$ ). El fet d'agregar l'expressió de RANK a la resta de predictors incrementava la predicció d'invasió de ganglis limfàtics un 2.3%. Es doncs, el primer estudi que mostra que l'extensió d'expressió de RANK en el teixit primari es capaç de predir la probabilitat de disseminació locoregional. De forma similar, en

càncer de mama alguns autors descriuen una correlació entre una major expressió de RANK en el tumor primari i major risc de desenvolupament de metàstasis [332].

L'expressió de RANKL en el teixit prostàtic tumoral primari va demostrar ésser predictora de metàstasis global, tot i això RANKL no funcionaria doncs com a predictor de metàstasis limfàtiques o òssies en particular. No es va objectivar relació entre l'expressió de la molècula RANKL en el teixit tumoral prostàtic primari i la supervivència global. Pocs estudis fins a l'actualitat han aconseguit relacionar nivells d'expressió d'alguna d'aquestes molècules amb supervivència global o supervivència lliure de metàstasis. Recentment, un grup italià analitza nivells d'expressió de RANK en teixit primari de càncer de mama [332] mostrant una correlació positiva amb el desenvolupament de metàstasis i amb una supervivència lliure de metàstasis escurçada.

Arrel d'aquests resultats vàrem analitzar la corba ROC per als diferents nivells d'expressió sense objectivar cap punt de tall que permeti establir una discriminació clínicament significativa.

Donats els nostres resultats, podem concloure que es tracta doncs d'una molècula clarament implicada en el procés metastàtic del càncer de pròstata sense poder determinar clarament la seva utilitat clínica com a marcador en el teixit prostàtic tumoral primari.

Hem intentat de donar certes raons objectives per a les troballes objectivades ja que els nostres resultats no són coherents amb la hipòtesi inicial on esperàvem trobar diferències en l'expressió de RANKL en el teixit prostàtic tumoral primari en relació amb la presència de metàstasis òssies.

En primer lloc, cal tenir en compte que la tècnica de tinció immunohistoquímica fou difícil d'establir. Els diferents autors mencionats utilitzen diferents tècniques no clarament especificades. La reproductibilitat dels resultats es troba qüestionada. Vàrem utilitzar diferents concentracions de l'anticòs per tal d'establir quina d'elles ens permetia una millor lectura, així com vàrem utilitzar tan PBS com citrat per al desemascament dels antígens.

Com sabem la tècnica IHQ es fins a cert punt subjectiva tan pel que fa a la lectura (tot i ésser realitzada en el nostre cas per un únic patòleg) com a la tècnica en si. Existeix tot sovint certa tinció de fons que moltes vegades dificulta la correcte lectura.

Finalment, ens plantegem analitzar l'especificitat del marcador utilitzat en la tinció per tal de veure si allò que la companyia determina com específic per RANKL ho era realment. Al procedir a la realització d'un estudi Western Blot de l'anticòs utilitzat vàrem observar que la banda RANKL (35KDa) no és única, sinó que l'anticòs detecta també altres proteïnes no relacionades amb el complex RANKL (multibanda).

## CONCLUSIONS

---

1. L'expressió IHQ de RANKL en el teixit primari de CaP en pacient amb malaltia metastàtica és significativament major que l'expressió en els pacient amb CaP no metastàtic.
2. L'expressió IHQ de RANKL en el teixit primari de CaP en pacients amb diferents graus d'extensió de la malaltia òssia es similar; no havent-se demostrat diferències significatives entre els diferents graus d'extensió.
3. S'objectiva un increment de l'expressió IHQ de RANKL en el teixit primari de CaP al incrementar el risc de disseminació tumoral. Concretament els nivells d'expressió IHQ de RANKL en teixit primari de CaP en pacients amb alt risc de disseminació metastàtica són similars als d'aquells pacients que ja presenten malaltia metastàtica.
4. L'expressió IHQ de RANKL al teixit primari de CaP fou similar en els pacients amb metàstasis òssies i en els pacients amb metàstasis limfàtiques.
5. L'expressió IHQ de RANKL en el teixit primari de CaP en pacients amb malaltia disseminada es mostrà predictora de metàstasi global, però no específicament de metàstasi òssia; essent similar en metàstasis òssies i limfàtiques.
6. L'expressió IHQ de RANKL en el teixit primari de CaP no es relacionà amb la supervivència dels pacients amb disseminació òssia.

7. Com a conclusió addicional, es va realitzar una avaluació de l'anticòs RANKL utilitzat objectivant que no es específic de la molècula RANKL. L'estudi de la nostra mostra amb un anticòs específic per RANKL hauria de confirmar la nostra hipòtesi inicial de relació entre la seva expressió en el tumor primari i el desenvolupament de metàstasis òssies.

## REFERENCES

---



1. Brown, M.L., J. Lipscomb, and C. Snyder, *The burden of illness of cancer: economic cost and quality of life*. *Annu Rev Public Health*, 2001. **22**: p. 91-113.
2. Santos Arrontes, D., et al., [*Influence of climate, according to Koppen classification and Lang's index, on gross rate mortality associated with prostate cancer in the geographical area of Spain*]. *Actas Urol Esp*, 2005. **29**(9): p. 828-33.
3. Bray, F., et al., *Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995*. *Eur J Cancer*, 2002. **38**(1): p. 99-166.
4. Black, R.J., et al., *Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990*. *Eur J Cancer*, 1997. **33**(7): p. 1075-107.
5. Parkin, D.M., et al., *Estimating the world cancer burden: Globocan 2000*. *Int J Cancer*, 2001. **94**(2): p. 153-6.
6. Denis, L.J., *Staging and prognosis of prostate cancer*. *Eur Urol*, 1993. **24 Suppl 2**: p. 13-8.
7. Berruti, A., et al., *Background to and management of treatment-related bone loss in prostate cancer*. *Drugs Aging*, 2002. **19**(12): p. 899-910.
8. Dickman, P.W., et al., *Hip Fractures In Men With Prostate Cancer Treated With Orchiectomy*. *J Urol*, 2004. **172**(6, Part 1 of 2): p. 2208-2212.
9. Small, E.J., *Prostate cancer, Incidence, management and outcomes*. *Drugs Aging*, 1998. **13**(1): p. 71-81.

10. Van Cangh, P.J., J.L. Gala, and B. Tombal, *Immediate vs. delayed androgen deprivation for prostate cancer*. Prostate Suppl, 2000. **10**: p. 19-25.
11. Sant, M., et al., *EUROCORE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94--results and commentary*. Ann Oncol, 2003. **14 Suppl 5**: p. v61-118.
12. *Survival of Cancer Patients in Europe: The EUROCORE-2 study*. IARC Sci Publ, 1999(151): p. 1-572.
13. Dennis, L.K. and M.I. Resnick, *Analysis of recent trends in prostate cancer incidence and mortality*. Prostate, 2000. **42**(4): p. 247-52.
14. Pound, C.R., et al., *Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy*. Jama, 1999. **281**(17): p. 1591-7.
15. Crawford, E.D., *Hormonal therapy of prostatic carcinoma. Defining the challenge*. Cancer, 1990. **66**(5 Suppl): p. 1035-8.
16. Gerber, G.S. and G.W. Chodak, *Routine screening for cancer of the prostate*. J Natl Cancer Inst, 1991. **83**(5): p. 329-35.
17. Hodge, K.K., et al., *Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate*. J Urol, 1989. **142**(1): p. 71-4; discussion 74-5.
18. Ellis, W.J., et al., *Diagnosis of prostatic carcinoma: the yield of serum prostate specific antigen, digital rectal examination and transrectal ultrasonography*. J Urol, 1994. **152**(5 Pt 1): p. 1520-5.
19. Carvalhal, G.F., et al., *Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng./ml. or less*. J Urol, 1999. **161**(3): p. 835-9.

20. Eastham, J.A., et al., *Development of a nomogram that predicts the probability of a positive prostate biopsy in men with an abnormal digital rectal examination and a prostate-specific antigen between 0 and 4 ng/mL*. Urology, 1999. **54**(4): p. 709-13.
21. Catalona, W.J., et al., *Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men*. J Urol, 1994. **151**(5): p. 1283-90.
22. Polascik, T.J., J.E. Oesterling, and A.W. Partin, *Prostate specific antigen: a decade of discovery--what we have learned and where we are going*. J Urol, 1999. **162**(2): p. 293-306.
23. van der Pluijm, G., et al., *Interference with the microenvironmental support impairs the de novo formation of bone metastases in vivo*. Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 7682-90.
24. Wirth, M.P. and H.G. Frohmuller, *Prostate-specific antigen and prostate acid phosphatase in the detection of early prostate cancer and the prediction of regional lymph node metastases*. Eur Urol, 1992. **22**(1): p. 27-32.
25. Catalona, W.J., et al., *Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer*. N Engl J Med, 1991. **324**(17): p. 1156-61.
26. Aus, G., et al., *Cumulative prostate cancer risk assessment with the aid of the free-to-total prostate specific antigen ratio*. Eur Urol, 2004. **45**(2): p. 160-5.

27. Lodding, P., et al., *Characteristics of screening detected prostate cancer in men 50 to 66 years old with 3 to 4 ng./ml. Prostate specific antigen*. J Urol, 1998. **159**(3): p. 899-903.
28. Horninger, W., et al., *Prostate cancer screening in the Tyrol, Austria: experience and results*. Eur J Cancer, 2000. **36**(10): p. 1322-35.
29. Thompson, I.M., et al., *Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter*. N Engl J Med, 2004. **350**(22): p. 2239-46.
30. Stamey, T.A., et al., *Localized prostate cancer. Relationship of tumor volume to clinical significance for treatment of prostate cancer*. Cancer, 1993. **71**(3 Suppl): p. 933-8.
31. Benson, M.C., et al., *Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer*. J Urol, 1992. **147**(3 Pt 2): p. 815-6.
32. Zlotta, A.R., et al., *Prostate specific antigen density of the transition zone: a new effective parameter for prostate cancer prediction*. J Urol, 1997. **157**(4): p. 1315-21.
33. Catalona, W.J., *Screening for prostate cancer*. Jama, 1995. **273**(15): p. 1174; author reply 1175-6.
34. Okihara, K., et al., *Comparative analysis of complexed prostate specific antigen, free prostate specific antigen and their ratio in detecting prostate cancer*. J Urol, 2002. **167**(5): p. 2017-23; discussion 2023-4.
35. Huber, P.R., et al., *Serum free prostate specific antigen: isoenzymes in benign hyperplasia and cancer of the prostate*. Prostate, 1995. **27**(4): p. 212-9.

36. Carter, H.B., et al., *Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease*. *Jama*, 1992. **267**(16): p. 2215-20.
37. Schmid, H.P., J.E. McNeal, and T.A. Stamey, *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*, 1993. **71**(6): p. 2031-40.
38. Lee, F., S.T. Torp-Pedersen, and D.B. Siders, *Use of transrectal ultrasound in diagnosis, guided biopsy, staging, and screening of prostate cancer*. *Urology*, 1989. **33**(6 Suppl): p. 7-12.
39. Gustafsson, O., et al., *Diagnostic methods in the detection of prostate cancer: a study of a randomly selected population of 2,400 men*. *J Urol*, 1992. **148**(6): p. 1827-31.
40. Mettlin, C., et al., *The results of a five-year early prostate cancer detection intervention. Investigators of the American Cancer Society National Prostate Cancer Detection Project*. *Cancer*, 1996. **77**(1): p. 150-9.
41. Esposti, P.L., A. Elman, and H. Norlen, *Complications of transrectal aspiration biopsy of the prostate*. *Scand J Urol Nephrol*, 1975. **9**(3): p. 208-13.
42. Aus, G., et al., *Infection after transrectal core biopsies of the prostate--risk factors and antibiotic prophylaxis*. *Br J Urol*, 1996. **77**(6): p. 851-5.
43. Collins, G.N., et al., *Multiple transrectal ultrasound-guided prostatic biopsies--true morbidity and patient acceptance*. *Br J Urol*, 1993. **71**(4): p. 460-3.

44. Frauscher, F., et al., *Comparison of contrast enhanced color Doppler targeted biopsy with conventional systematic biopsy: impact on prostate cancer detection.* J Urol, 2002. **167**(4): p. 1648-52.
45. Aus, G., et al., *Diagnosis of prostate cancer: optimal number of prostate biopsies related to serum prostate-specific antigen and findings on digital rectal examination.* Scand J Urol Nephrol, 1997. **31**(6): p. 541-4.
46. Stamey, T.A., *Making the most out of six systematic sextant biopsies.* Urology, 1995. **45**(1): p. 2-12.
47. Aus, G., et al., *Outcome of laterally directed sextant biopsies of the prostate in screened males aged 50--66 years. Implications for sampling order.* Eur Urol, 2001. **39**(6): p. 655-60; discussion 661.
48. Eskew, L.A., R.L. Bare, and D.L. McCullough, *Systematic 5 region prostate biopsy is superior to sextant method for diagnosing carcinoma of the prostate.* J Urol, 1997. **157**(1): p. 199-202; discussion 202-3.
49. Morote, J., et al., *Value of routine transition zone biopsies in patients undergoing ultrasound-guided sextant biopsies for the first time.* Eur Urol, 1999. **35**(4): p. 294-7.
50. Terris, M.K., et al., *Routine transition zone and seminal vesicle biopsies in all patients undergoing transrectal ultrasound guided prostate biopsies are not indicated.* J Urol, 1997. **157**(1): p. 204-6.
51. Applewhite, J.C., B.R. Matlaga, and D.L. McCullough, *Results of the 5 region prostate biopsy method: the repeat biopsy population.* J Urol, 2002. **168**(2): p. 500-3.

52. Roehrborn, C.G., G.J. Pickens, and T. Carmody, 3rd, *Variability of repeated serum prostate-specific antigen (PSA) measurements within less than 90 days in a well-defined patient population*. *Urology*, 1996. **47**(1): p. 59-66.
53. Zlotta, A.R., G. Raviv, and C.C. Schulman, *Clinical prognostic criteria for later diagnosis of prostate carcinoma in patients with initial isolated prostatic intraepithelial neoplasia*. *Eur Urol*, 1996. **30**(2): p. 249-55.
54. Haggman, M.J., et al., *The relationship between prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer: critical issues*. *J Urol*, 1997. **158**(1): p. 12-22.
55. Ohori, M., T.M. Wheeler, and P.T. Scardino, *The New American Joint Committee on Cancer and International Union Against Cancer TNM classification of prostate cancer. Clinicopathologic correlations*. *Cancer*, 1994. **74**(1): p. 104-14.
56. Spigelman, S.S., et al., *Rectal examination in volume determination of carcinoma of the prostate: clinical and anatomical correlations*. *J Urol*, 1986. **136**(6): p. 1228-30.
57. Hudson, M.A., R.R. Bahnson, and W.J. Catalona, *Clinical use of prostate specific antigen in patients with prostate cancer*. *J Urol*, 1989. **142**(4): p. 1011-7.
58. Lange, P.H., et al., *The value of serum prostate specific antigen determinations before and after radical prostatectomy*. *J Urol*, 1989. **141**(4): p. 873-9.

59. Partin, A.W., et al., *Prostate specific antigen in the staging of localized prostate cancer: influence of tumor differentiation, tumor volume and benign hyperplasia*. J Urol, 1990. **143**(4): p. 747-52.
60. Partin, A.W., et al., *Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium*. Urology, 2001. **58**(6): p. 843-8.
61. Anfossi, E., et al., *[What is the role of the correspondence of free PSA/total PSA in the staging of local prostate cancer? Series of 50 radical prostatectomy cases]*. Prog Urol, 1999. **9**(3): p. 479-82.
62. Enlund, A., et al., *Transrectal ultrasonography compared to histopathological assessment for local staging of prostatic carcinoma*. Acta Radiol, 1990. **31**(6): p. 597-600.
63. Rorvik, J., et al., *Transrectal ultrasonography to assess local extent of prostatic cancer before radical prostatectomy*. Br J Urol, 1994. **73**(1): p. 65-9.
64. Smith, J.A., Jr., et al., *Transrectal ultrasound versus digital rectal examination for the staging of carcinoma of the prostate: results of a prospective, multi-institutional trial*. J Urol, 1997. **157**(3): p. 902-6.
65. Liebross, R.H., et al., *Transrectal ultrasound for staging prostate carcinoma prior to radiation therapy: an evaluation based on disease outcome*. Cancer, 1999. **85**(7): p. 1577-85.
66. Saliken, J.C., et al., *Extraprostatic biopsy improves the staging of localized prostate cancer*. Can Assoc Radiol J, 2000. **51**(2): p. 114-20.



67. Stone, N.N., R.G. Stock, and P. Unger, *Indications for seminal vesicle biopsy and laparoscopic pelvic lymph node dissection in men with localized carcinoma of the prostate*. J Urol, 1995. **154**(4): p. 1392-6.
68. Allepuz Losa, C.A., et al., *Seminal vesicle biopsy in prostate cancer staging*. J Urol, 1995. **154**(4): p. 1407-11.
69. Hammerer, P., H. Huland, and A. Sparenberg, *Digital rectal examination, imaging, and systematic-sextant biopsy in identifying operable lymph node-negative prostatic carcinoma*. Eur Urol, 1992. **22**(4): p. 281-7.
70. Ravery, V., et al., *Is the percentage of cancer in biopsy cores predictive of extracapsular disease in T1-T2 prostate carcinoma?* Cancer, 1996. **78**(5): p. 1079-84.
71. Sebo, T.J., et al., *The percent of cores positive for cancer in prostate needle biopsy specimens is strongly predictive of tumor stage and volume at radical prostatectomy*. J Urol, 2000. **163**(1): p. 174-8.
72. Narayan, P., et al., *The role of transrectal ultrasound-guided biopsy-based staging, preoperative serum prostate-specific antigen, and biopsy Gleason score in prediction of final pathologic diagnosis in prostate cancer*. Urology, 1995. **46**(2): p. 205-12.
73. Lee, N., et al., *Which patients with newly diagnosed prostate cancer need a computed tomography scan of the abdomen and pelvis? An analysis based on 588 patients*. Urology, 1999. **54**(3): p. 490-4.
74. May, F., et al., *Limited value of endorectal magnetic resonance imaging and transrectal ultrasonography in the staging of clinically localized prostate cancer*. BJU Int, 2001. **87**(1): p. 66-9.

75. Stone, N.N., et al., *Perineural invasion and seminal vesicle involvement predict pelvic lymph node metastasis in men with localized carcinoma of the prostate*. J Urol, 1998. **160**(5): p. 1722-6.
76. Pisansky, T.M., et al., *Correlation of pretherapy prostate cancer characteristics with histologic findings from pelvic lymphadenectomy specimens*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996. **34**(1): p. 33-9.
77. Haese, A., et al., *Validation of a biopsy-based pathologic algorithm for predicting lymph node metastases in patients with clinically localized prostate carcinoma*. Cancer, 2002. **95**(5): p. 1016-21.
78. Heidenreich, A., Z. Varga, and R. Von Knobloch, *Extended pelvic lymphadenectomy in patients undergoing radical prostatectomy: high incidence of lymph node metastasis*. J Urol, 2002. **167**(4): p. 1681-6.
79. Bader, P., et al., *Is a limited lymph node dissection an adequate staging procedure for prostate cancer?* J Urol, 2002. **168**(2): p. 514-8; discussion 518.
80. Van Poppel, H., et al., *Accuracy of combined computerized tomography and fine needle aspiration cytology in lymph node staging of localized prostatic carcinoma*. J Urol, 1994. **151**(5): p. 1310-4.
81. Huncharek, M. and J. Muscat, *Serum prostate-specific antigen as a predictor of staging abdominal/pelvic computed tomography in newly diagnosed prostate cancer*. Abdom Imaging, 1996. **21**(4): p. 364-7.
82. Wolf, J.S., Jr., et al., *The use and accuracy of cross-sectional imaging and fine needle aspiration cytology for detection of pelvic lymph node metastases before radical prostatectomy*. J Urol, 1995. **153**(3 Pt 2): p. 993-9.

83. Tiguert, R., et al., *Lymph node size does not correlate with the presence of prostate cancer metastasis*. Urology, 1999. **53**(2): p. 367-71.
84. Babaian, R.J., et al., *Radioimmunoscinigraphy of pelvic lymph nodes with 111indium-labeled monoclonal antibody CYT-356*. J Urol, 1994. **152**(6 Pt 1): p. 1952-5.
85. Effert, P.J., et al., *Metabolic imaging of untreated prostate cancer by positron emission tomography with 18fluorine-labeled deoxyglucose*. J Urol, 1996. **155**(3): p. 994-8.
86. Whitmore, W.F., Jr., *Natural history and staging of prostate cancer*. Urol Clin North Am, 1984. **11**(2): p. 205-20.
87. Wolff, J.M., et al., *Metastatic workup of patients with prostate cancer employing alkaline phosphatase and skeletal alkaline phosphatase*. Anticancer Res, 1999. **19**(4A): p. 2653-5.
88. Lorente, J.A., et al., *Clinical efficacy of bone alkaline phosphatase and prostate specific antigen in the diagnosis of bone metastasis in prostate cancer*. J Urol, 1996. **155**(4): p. 1348-51.
89. Lorente, J.A., et al., *Serum bone alkaline phosphatase levels enhance the clinical utility of prostate specific antigen in the staging of newly diagnosed prostate cancer patients*. Eur J Nucl Med, 1999. **26**(6): p. 625-32.
90. McGregor, B., et al., *The role of bone scanning in the assessment of prostatic carcinoma*. Br J Urol, 1978. **50**(3): p. 178-81.
91. O'Donoghue, E.P., et al., *Bone scanning and plasma phosphatases in carcinoma of the prostate*. Br J Urol, 1978. **50**(3): p. 172-7.

92. Buell, U., et al., *A comparison of bone imaging with Tc-99m DPD and Tc-99m MDP: concise communication*. J Nucl Med, 1982. **23**(3): p. 214-7.
93. Soloway, M.S., et al., *Stratification of patients with metastatic prostate cancer based on extent of disease on initial bone scan*. Cancer, 1988. **61**(1): p. 195-202.
94. Rana, A., et al., *Identification of metastatic disease by T category, gleason score and serum PSA level in patients with carcinoma of the prostate*. Br J Urol, 1992. **69**(3): p. 277-81.
95. Chybowski, F.M., 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, 1991. **145**(2): p. 313-8.
96. Kemp, P.M., G.A. Maguire, and N.J. Bird, *Which patients with prostatic carcinoma require a staging bone scan?* Br J Urol, 1997. **79**(4): p. 611-4.
97. Lee, N., et al., *Which patients with newly diagnosed prostate cancer need a radionuclide bone scan? An analysis based on 631 patients*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000. **48**(5): p. 1443-6.
98. Wolff, J.M., et al., *Is prostate-specific antigen a reliable marker of bone metastasis in patients with newly diagnosed cancer of the prostate?* Eur Urol, 1998. **33**(4): p. 376-81.
99. Bruwer, G., C.F. Heyns, and F.J. Allen, *Influence of local tumour stage and grade on reliability of serum prostate-specific antigen in predicting*

- skeletal metastases in patients with adenocarcinoma of the prostate.* Eur Urol, 1999. **35**(3): p. 223-7.
100. Kattan, M.W., M.E. Cowen, and B.J. Miles, *A decision analysis for treatment of clinically localized prostate cancer.* J Gen Intern Med, 1997. **12**(5): p. 299-305.
101. Adolfsson, J., *Deferred treatment of low grade stage T3 prostate cancer without distant metastases.* J Urol, 1993. **149**(2): p. 326-8; discussion 328-9.
102. Chodak, G.W., et al., *Results of conservative management of clinically localized prostate cancer.* N Engl J Med, 1994. **330**(4): p. 242-8.
103. Albertsen, P.C., et al., *Competing risk analysis of men aged 55 to 74 years at diagnosis managed conservatively for clinically localized prostate cancer.* Jama, 1998. **280**(11): p. 975-80.
104. Abbou, C.C., et al., *Laparoscopic radical prostatectomy: preliminary results.* Urology, 2000. **55**(5): p. 630-4.
105. Rassweiler, J., et al., *Laparoscopic radical prostatectomy with the Heilbronn technique: an analysis of the first 180 cases.* J Urol, 2001. **166**(6): p. 2101-8.
106. Walsh, P.C. and P.J. Donker, *Impotence following radical prostatectomy: insight into etiology and prevention.* J Urol, 1982. **128**(3): p. 492-7.
107. Holmberg, L., et al., *A randomized trial comparing radical prostatectomy with watchful waiting in early prostate cancer.* N Engl J Med, 2002. **347**(11): p. 781-9.

108. Lepor, H., A.M. Nieder, and M.N. Ferrandino, *Intraoperative and postoperative complications of radical retropubic prostatectomy in a consecutive series of 1,000 cases*. J Urol, 2001. **166**(5): p. 1729-33.
109. Maffezzini, M., et al., *Evaluation of complications and results in a contemporary series of 300 consecutive radical retropubic prostatectomies with the anatomic approach at a single institution*. Urology, 2003. **61**(5): p. 982-6.
110. Corral, D.A. and R.R. Bahnson, *Survival of men with clinically localized prostate cancer detected in the eighth decade of life*. J Urol, 1994. **151**(5): p. 1326-9.
111. Lowe, B.A. and M.B. Listrom, *Incidental carcinoma of the prostate: an analysis of the predictors of progression*. J Urol, 1988. **140**(6): p. 1340-4.
112. Elgamal, A.A., et al., *Impalpable invisible stage T1c prostate cancer: characteristics and clinical relevance in 100 radical prostatectomy specimens--a different view*. J Urol, 1997. **157**(1): p. 244-50.
113. Oesterling, J.E., et al., *PSA-detected (clinical stage T1c or B0) prostate cancer. Pathologically significant tumors*. Urol Clin North Am, 1993. **20**(4): p. 687-93.
114. Epstein, J.I., P.C. Walsh, and C.B. Brendler, *Radical prostatectomy for impalpable prostate cancer: the Johns Hopkins experience with tumors found on transurethral resection (stages T1A and T1B) and on needle biopsy (stage T1C)*. J Urol, 1994. **152**(5 Pt 2): p. 1721-9.

115. Epstein, J.I., et al., *Nonpalpable stage T1c prostate cancer: prediction of insignificant disease using free/total prostate specific antigen levels and needle biopsy findings*. J Urol, 1998. **160**(6 Pt 2): p. 2407-11.
116. D'Amico, A.V., et al., *Combination of the preoperative PSA level, biopsy gleason score, percentage of positive biopsies, and MRI T-stage to predict early PSA failure in men with clinically localized prostate cancer*. Urology, 2000. **55**(4): p. 572-7.
117. Epstein, J.I., et al., *Adenocarcinoma of the prostate invading the seminal vesicle: prognostic stratification based on pathologic parameters*. Urology, 2000. **56**(2): p. 283-8.
118. Gibbons, R.P., *Total prostatectomy for clinically localized prostate cancer: long-term surgical results and current morbidity*. NCI Monogr, 1988(7): p. 123-6.
119. Pound, C.R., et al., *Prostate-specific antigen after anatomic radical retropubic prostatectomy. Patterns of recurrence and cancer control*. Urol Clin North Am, 1997. **24**(2): p. 395-406.
120. Ohori, M., et al., *Can radical prostatectomy alter the progression of poorly differentiated prostate cancer?* J Urol, 1994. **152**(5 Pt 2): p. 1843-9.
121. Graverson, P.H., et al., *Radical prostatectomy versus expectant primary treatment in stages I and II prostatic cancer. A fifteen-year follow-up*. Urology, 1990. **36**(6): p. 493-8.
122. Eastham, J.A., et al., *Variations among individual surgeons in the rate of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens*. J Urol, 2003. **170**(6 Pt 1): p. 2292-5.

123. Walsh, P.C., *Surgery and the reduction of mortality from prostate cancer*. N Engl J Med, 2002. **347**(11): p. 839-40.
124. Lerner, S.E., M.L. Blute, and H. Zincke, *Extended experience with radical prostatectomy for clinical stage T3 prostate cancer: outcome and contemporary morbidity*. J Urol, 1995. **154**(4): p. 1447-52.
125. Van Poppel, H., et al., *Radical prostatectomy can provide a cure for well-selected clinical stage T3 prostate cancer*. Eur Urol, 2000. **38**(4): p. 372-9.
126. Powell, I.J., et al., *Neoadjuvant therapy before radical prostatectomy for clinical T3/T4 carcinoma of the prostate: 5-year followup, Phase II Southwest Oncology Group Study 9109*. J Urol, 2002. **168**(5): p. 2016-9.
127. Gerber, G.S., et al., *Results of radical prostatectomy in men with locally advanced prostate cancer: multi-institutional pooled analysis*. Eur Urol, 1997. **32**(4): p. 385-90.
128. Fallon, B. and R.D. Williams, *Current options in the management of clinical stage C prostatic carcinoma*. Urol Clin North Am, 1990. **17**(4): p. 853-66.
129. Boccon-Gibod, L., et al., *Management of locally advanced prostate cancer: a European consensus*. Int J Clin Pract, 2003. **57**(3): p. 187-94.
130. Bolla, M., et al., *Long-term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study): a phase III randomised trial*. Lancet, 2002. **360**(9327): p. 103-6.



131. Ghavamian, R., et al., *Radical retropubic prostatectomy plus orchiectomy versus orchiectomy alone for pTxN+ prostate cancer: a matched comparison*. J Urol, 1999. **161**(4): p. 1223-7; discussion 1227-8.
132. *Consensus statement: the Management of Clinically Localized Prostate Cancer*. National Institutes of Health Consensus Development Panel. NCI Monogr, 1988(7): p. 3-6.
133. Fowler, F.J., Jr., et al., *Outcomes of external-beam radiation therapy for prostate cancer: a study of Medicare beneficiaries in three surveillance, epidemiology, and end results areas*. J Clin Oncol, 1996. **14**(8): p. 2258-65.
134. Hanks, G.E., et al., *Dose escalation with 3D conformal treatment: five year outcomes, treatment optimization, and future directions*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998. **41**(3): p. 501-10.
135. Leibel, S.A., et al., *The biological basis and clinical application of three-dimensional conformal external beam radiation therapy in carcinoma of the prostate*. Semin Oncol, 1994. **21**(5): p. 580-97.
136. Zelefsky, M.J., et al., *Dose escalation with three-dimensional conformal radiation therapy affects the outcome in prostate cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998. **41**(3): p. 491-500.
137. Pollack, A., et al., *Preliminary results of a randomized radiotherapy dose-escalation study comparing 70 Gy with 78 Gy for prostate cancer*. J Clin Oncol, 2000. **18**(23): p. 3904-11.

138. Beckendorf, V., et al., *The GETUG 70 Gy vs. 80 Gy randomized trial for localized prostate cancer: feasibility and acute toxicity*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **60**(4): p. 1056-65.
139. Studer, U., et al., *Using PSA to guide timing of androgen deprivation in patients with T0-4 N0-2 M0 prostate cancer not suitable for local curative treatment (EORTC 30891)*. Eur Urol, 2008. **53**(5): p. 941-9.
140. D'Amico, A.V., et al., *6-month androgen suppression plus radiation therapy vs radiation therapy alone for patients with clinically localized prostate cancer: a randomized controlled trial*. JAMA, 2004. **292**(7): p. 821-7.
141. Hanks, G.E., *External-beam radiation therapy for clinically localized prostate cancer: patterns of care studies in the United States*. NCI Monogr, 1988(7): p. 75-84.
142. Kupelian, P.A., et al., *Stage T1-2 prostate cancer: a multivariate analysis of factors affecting biochemical and clinical failures after radical prostatectomy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997. **37**(5): p. 1043-52.
143. Van Cangh, P.J., et al., *Adjuvant radiation therapy does not cause urinary incontinence after radical prostatectomy: results of a prospective randomized study*. J Urol, 1998. **159**(1): p. 164-6.
144. Cox, J.D., et al., *Consensus statements on radiation therapy of prostate cancer: guidelines for prostate re-biopsy after radiation and for radiation therapy with rising prostate-specific antigen levels after radical prostatectomy*. American Society for Therapeutic Radiology and Oncology Consensus Panel. J Clin Oncol, 1999. **17**(4): p. 1155.

145. Wilder, R.B., et al., *Preliminary results of three-dimensional conformal radiotherapy as salvage treatment for a rising prostate-specific antigen level postprostatectomy*. Am J Clin Oncol, 2000. **23**(2): p. 176-80.
146. Bagshaw, M.A., R.S. Cox, and G.R. Ray, *Status of radiation treatment of prostate cancer at Stanford University*. NCI Monogr, 1988(7): p. 47-60.
147. Zietman, A.L. and W.U. Shipley, *Androgen deprivation and radiation therapy in prostate cancer: the evolving case for combination therapy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997. **37**(2): p. 245-6.
148. Joon, D.L., et al., *Supraadditive apoptotic response of R3327-G rat prostate tumors to androgen ablation and radiation*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997. **38**(5): p. 1071-7.
149. Pilepich, M.V., et al., *Phase III radiation therapy oncology group (RTOG) trial 86-10 of androgen deprivation adjuvant to definitive radiotherapy in locally advanced carcinoma of the prostate*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **50**(5): p. 1243-52.
150. Lawton, C.A., et al., *Androgen suppression plus radiation versus radiation alone for patients with D1 (pN+) adenocarcinoma of the prostate (results based on a national prospective randomized trial, RTOG 85-31)*. Radiation Therapy Oncology Group. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997. **38**(5): p. 931-9.
151. Hanks, G.E., et al., *Phase III trial of long-term adjuvant androgen deprivation after neoadjuvant hormonal cytoreduction and radiotherapy in locally advanced carcinoma of the prostate: the Radiation Therapy Oncology Group Protocol 92-02*. J Clin Oncol, 2003. **21**(21): p. 3972-8.

152. Huggins, C. and C.V. Hodges, *Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate.* CA Cancer J Clin, 1972. **22**(4): p. 232-40.
153. McLeod, D.G., *Hormonal therapy: historical perspective to future directions.* Urology, 2003. **61**(2 Suppl 1): p. 3-7.
154. Schalken, J.A. and G. van Leenders, *Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology.* Urology, 2003. **62**(5 Suppl 1): p. 11-20.
155. Denmeade, S.R., X.S. Lin, and J.T. Isaacs, *Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer.* Prostate, 1996. **28**(4): p. 251-65.
156. van Leenders, G.J. and J.A. Schalken, *Stem cell differentiation within the human prostate epithelium: implications for prostate carcinogenesis.* BJU Int, 2001. **88 Suppl 2**: p. 35-42; discussion 49-50.
157. Magi-Galluzzi, C. and M. Loda, *Molecular events in the early phases of prostate carcinogenesis.* Eur Urol, 1996. **30**(2): p. 167-76.
158. Isaacs, J.T., *The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop?* Urol Clin North Am, 1999. **26**(2): p. 263-73.
159. Nakada, S.Y., et al., *The androgen receptor status of neuroendocrine cells in human benign and malignant prostatic tissue.* Cancer Res, 1993. **53**(9): p. 1967-70.
160. Liao, S., et al., *Active forms and biodynamics of the androgen-receptor in various target tissues.* Curr Top Mol Endocrinol, 1976. **4**: p. 139-51.

161. Bruchovsky, N., et al., *The influence of androgen receptors on the concentration of androgens in nuclei of hormone-responsive cells.* J Steroid Biochem, 1975. **6**(5): p. 551-60.
162. Krieg, M., et al., *A comparative study of binding, metabolism and endogenous levels of androgens in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate.* J Steroid Biochem, 1979. **11**(1B): p. 615-24.
163. Kaisary, A.V., et al., *Comparison of LHRH analogue (Zoladex) with orchiectomy in patients with metastatic prostatic carcinoma.* Br J Urol, 1991. **67**(5): p. 502-8.
164. Vogelzang, N.J., et al., *Goserelin versus orchiectomy in the treatment of advanced prostate cancer: final results of a randomized trial. Zoladex Prostate Study Group.* Urology, 1995. **46**(2): p. 220-6.
165. Parmar, H., et al., *Orchiectomy versus long-acting D-Trp-6-LHRH in advanced prostatic cancer.* Br J Urol, 1987. **59**(3): p. 248-54.
166. Bruun, E. and C. Frimodt-Moller, *The effect of Buserelin versus conventional antiandrogenic treatment in patients with T2-4NXM1 prostatic cancer. A prospective, randomized multicentre phase III trial. The "Danish Buserelin Study Group".* Scand J Urol Nephrol, 1996. **30**(4): p. 291-7.
167. Seidenfeld, J., et al., *Single-therapy androgen suppression in men with advanced prostate cancer: a systematic review and meta-analysis.* Ann Intern Med, 2000. **132**(7): p. 566-77.

168. Miyamoto, H., E.M. Messing, and C. Chang, *Androgen deprivation therapy for prostate cancer: current status and future prospects*. Prostate, 2004. **61**(4): p. 332-53.
169. Loblaw, D.A., et al., *American Society of Clinical Oncology recommendations for the initial hormonal management of androgen-sensitive metastatic, recurrent, or progressive prostate cancer*. J Clin Oncol, 2004. **22**(14): p. 2927-41.
170. Oefelein, M.G. and M.I. Resnick, *Effective testosterone suppression for patients with prostate cancer: is there a best castration?* Urology, 2003. **62**(2): p. 207-13.
171. Byar, D.P., *Hormone therapy for prostate cancer: results of the Veterans Administration Cooperative Urological Research Group studies*. NCI Monogr, 1988(7): p. 165-70.
172. *Carcinoma of the prostate: treatment comparisons*. J Urol, 1967. **98**(4): p. 516-22.
173. Hedlund, P.O. and P. Henriksson, *Parenteral estrogen versus total androgen ablation in the treatment of advanced prostate carcinoma: effects on overall survival and cardiovascular mortality. The Scandinavian Prostatic Cancer Group (SPCG)-5 Trial Study*. Urology, 2000. **55**(3): p. 328-33.
174. Scherr, D., W.R. Pitts, Jr., and E.D. Vaughn, Jr., *Diethylstilbesterol revisited: androgen deprivation, osteoporosis and prostate cancer*. J Urol, 2002. **167**(2 Pt 1): p. 535-8.
175. Chang, C., et al., *Androgen receptor: an overview*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1995. **5**(2): p. 97-125.

176. Koppan, M., et al., *Targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone AN-207 inhibits the growth of PC-82 human prostate cancer in nude mice*. *Prostate*, 1999. **38**(2): p. 151-8.
177. Dondi, D., et al., *Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists on human androgen-independent prostate cancer cell line DU 145: evidence for an autocrine-inhibitory LHRH loop*. *Cancer Res*, 1994. **54**(15): p. 4091-5.
178. Labrie, F., et al., *DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology*. *Front Neuroendocrinol*, 2001. **22**(3): p. 185-212.
179. Kimura, K., et al., *Androgen blocks apoptosis of hormone-dependent prostate cancer cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(14): p. 5611-8.
180. Bubley, G.J., *Is the flare phenomenon clinically significant?* *Urology*, 2001. **58**(2 Suppl 1): p. 5-9.
181. Mahler, C., *Is disease flare a problem?* *Cancer*, 1993. **72**(12 Suppl): p. 3799-802.
182. Hall, M.C., et al., *Prospective determination of the hormonal response after cessation of luteinizing hormone-releasing hormone agonist treatment in patients with prostate cancer*. *Urology*, 1999. **53**(5): p. 898-902; discussion 902-3.
183. Tunn, U.W., et al., *Comparison of LH-RH analogue 1-month depot and 3-month depot by their hormone levels and pharmacokinetic profile in patients with advanced prostate cancer*. *Urol Int*, 1998. **60 Suppl 1**: p. 9-16; discussion 16-7.

184. Schally, A.V., A.J. Kastin, and A. Arimura, *Hypothalamic follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH)-regulating hormone: structure, physiology, and clinical studies*. Fertil Steril, 1971. **22**(11): p. 703-21.
185. Gommersall, L.M., et al., *Luteinising hormone releasing hormone analogues in the treatment of prostate cancer*. Expert Opin Pharmacother, 2002. **3**(12): p. 1685-92.
186. Schally, A.V., *Luteinizing hormone-releasing hormone analogs: their impact on the control of tumorigenesis*. Peptides, 1999. **20**(10): p. 1247-62.
187. Tolis, G., et al., *Tumor growth inhibition in patients with prostatic carcinoma treated with luteinizing hormone-releasing hormone agonists*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(5): p. 1658-62.
188. Limonta, P., M. Montagnani Marelli, and R.M. Moretti, *LHRH analogues as anticancer agents: pituitary and extrapituitary sites of action*. Expert Opin Investig Drugs, 2001. **10**(4): p. 709-20.
189. Kuhn, J.M., et al., *Prevention of the transient adverse effects of a gonadotropin-releasing hormone analogue (buserelin) in metastatic prostatic carcinoma by administration of an antiandrogen (nilutamide)*. N Engl J Med, 1989. **321**(7): p. 413-8.
190. Rizzo, M., et al., *Leuprorelin acetate depot in advanced prostatic cancer: a phase II multicentre trial*. J Int Med Res, 1990. **18 Suppl 1**: p. 114-25.



191. Perez-Marreno, R., et al., *A six-month, open-label study assessing a new formulation of leuprolide 7.5 mg for suppression of testosterone in patients with prostate cancer*. Clin Ther, 2002. **24**(11): p. 1902-14.
192. Chu, F.M., et al., *A clinical study of 22.5 mg. La-2550: A new subcutaneous depot delivery system for leuprolide acetate for the treatment of prostate cancer*. J Urol, 2002. **168**(3): p. 1199-203.
193. Fowler, J.E., et al., *Evaluation of an implant that delivers leuprolide for 1 year for the palliative treatment of prostate cancer*. Urology, 2000. **55**(5): p. 639-42.
194. Sharifi, R., et al., *Leuprolide acetate (30-mg depot every four months) in the treatment of advanced prostate cancer*. Urology, 1998. **51**(2): p. 271-6.
195. Bae, D.C. and B.S. Stein, *The diagnosis and treatment of osteoporosis in men on androgen deprivation therapy for advanced carcinoma of the prostate*. J Urol, 2004. **172**(6 Pt 1): p. 2137-44.
196. Peters, J.L., et al., *Bone loss associated with the use of LHRH agonists in prostate cancer*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2001. **4**(3): p. 161-166.
197. Anderson, J., *The role of antiandrogen monotherapy in the treatment of prostate cancer*. BJU Int, 2003. **91**(5): p. 455-61.
198. Labrie, F., R. Veilleux, and A. Fournier, *Low androgen levels induce the development of androgen-hypersensitive cell clones in Shionogi mouse mammary carcinoma cells in culture*. J Natl Cancer Inst, 1988. **80**(14): p. 1138-47.

199. Sogani, P.C., M.R. Vagaiwala, and W.F. Whitmore, Jr., *Experience with flutamide in patients with advanced prostatic cancer without prior endocrine therapy*. *Cancer*, 1984. **54**(4): p. 744-50.
200. McLeod, D.G. and G.J. Kolvenbag, *Defining the role of antiandrogens in the treatment of prostate cancer*. *Urology*, 1996. **47**(1A Suppl): p. 85-9; discussion 90-6.
201. Abrahamsson, P.A., *Treatment of locally advanced prostate cancer--a new role for antiandrogen monotherapy?* *Eur Urol*, 2001. **39 Suppl 1**: p. 22-8.
202. Iversen, P., *The third analysis of the bicalutamide Early Prostate Cancer programme*. *BJU Int*, 2006. **97**(3): p. 438-9.
203. See, W.A., et al., *Bicalutamide as immediate therapy either alone or as adjuvant to standard care of patients with localized or locally advanced prostate cancer: first analysis of the early prostate cancer program*. *J Urol*, 2002. **168**(2): p. 429-35.
204. Geller, J., *Prolonging survival in metastatic prostate cancer: the case for adrenal androgens--overview and summary of therapeutic controversies in prostatic cancer*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. **80**(4): p. 1074-8.
205. Schellhammer, P.F., et al., *Clinical benefits of bicalutamide compared with flutamide in combined androgen blockade for patients with advanced prostatic carcinoma: final report of a double-blind, randomized, multicenter trial*. *Casodex Combination Study Group*. *Urology*, 1997. **50**(3): p. 330-6.

206. Moul, J.W. and G. Chodak, *Combination hormonal therapy: a reassessment within advanced prostate cancer*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2004. **7 Suppl 1**: p. S2-7.
207. Denis, L.J., et al., *Maximal androgen blockade: final analysis of EORTC phase III trial 30853. EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Cooperative Group and the EORTC Data Center*. Eur Urol, 1998. **33(2)**: p. 144-51.
208. Labrie, F., et al., *New hormonal therapy in prostatic carcinoma: combined treatment with an LHRH agonist and an antiandrogen*. Clin Invest Med, 1982. **5(4)**: p. 267-75.
209. Crawford, E.D., et al., *A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma*. N Engl J Med, 1989. **321(7)**: p. 419-24.
210. *Maximum androgen blockade in advanced prostate cancer: an overview of 22 randomised trials with 3283 deaths in 5710 patients. Prostate Cancer Trialists' Collaborative Group*. Lancet, 1995. **346(8970)**: p. 265-9.
211. *Maximum androgen blockade in advanced prostate cancer: an overview of the randomised trials. Prostate Cancer Trialists' Collaborative Group*. Lancet, 2000. **355(9214)**: p. 1491-8.
212. Samson, D.J., et al., *Systematic review and meta-analysis of monotherapy compared with combined androgen blockade for patients with advanced prostate carcinoma*. Cancer, 2002. **95(2)**: p. 361-76.
213. Schmitt, B., et al., *Maximal androgen blockade for advanced prostate cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2000(2): p. CD001526.

214. Perez-Marreno, R., et al., *A six-month, open-label study assessing a new formulation of leuprolide 7.5 mg for suppression of testosterone in patients with prostate cancer*. Clin Ther, 2002. **24**(11): p. 1902-14.
215. Cox, R.L. and E.D. Crawford, *Estrogens in the treatment of prostate cancer*. J Urol, 1995. **154**(6): p. 1991-8.
216. *Immediate versus deferred treatment for advanced prostatic cancer: initial results of the Medical Research Council Trial. The Medical Research Council Prostate Cancer Working Party Investigators Group*. Br J Urol, 1997. **79**(2): p. 235-46.
217. Messing, E.M., et al., *Immediate hormonal therapy compared with observation after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy in men with node-positive prostate cancer*. N Engl J Med, 1999. **341**(24): p. 1781-8.
218. Freedland, S.J., et al., *Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy*. Jama, 2005. **294**(4): p. 433-9.
219. Zincke, H., et al., *Role of early adjuvant hormonal therapy after radical prostatectomy for prostate cancer*. J Urol, 2001. **166**(6): p. 2208-15.
220. *Harrison's Internal Medicine Principles. 14th Edition*.
221. Yasuda, H., et al., *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3597-602.
222. Suda, T., N. Takahashi, and E. Abe, *Role of vitamin D in bone resorption*. J Cell Biochem, 1992. **49**(1): p. 53-8.

223. Lacey, D.L., et al., *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell, 1998. **93**(2): p. 165-76.
224. Tatsumi, S., et al., *Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction*. Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 464-75.
225. Boyce, B.F. and L. Xing, *Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin*. Arthritis Res Ther, 2007. **9 Suppl 1**: p. S1.
226. Boyce, B.F., et al., *Regulation of bone remodeling and emerging breakthrough drugs for osteoporosis and osteolytic bone metastases*. Kidney Int Suppl, 2003(85): p. S2-5.
227. Zhao, C., et al., *Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis*. Cell Metab, 2006. **4**(2): p. 111-21.
228. Lee, S.H., et al., *v-ATPase V0 subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation*. Nat Med, 2006. **12**(12): p. 1403-9.
229. Kollet, O., et al., *Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells*. Nat Med, 2006. **12**(6): p. 657-64.
230. Xing, L., E.M. Schwarz, and B.F. Boyce, *Osteoclast precursors, RANKL/RANK, and immunology*. Immunol Rev, 2005. **208**: p. 19-29.
231. Yoshida, H., et al., *The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene*. Nature, 1990. **345**(6274): p. 442-4.
232. Simonet, W.S., et al., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell, 1997. **89**(2): p. 309-19.

233. Yasuda, H., et al., *Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro*. *Endocrinology*, 1998. **139**(3): p. 1329-37.
234. Wong, B.R., et al., *TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(40): p. 25190-4.
235. Franzoso, G., et al., *Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development*. *Genes Dev*, 1997. **11**(24): p. 3482-96.
236. Teitelbaum, S.L. and F.P. Ross, *Genetic regulation of osteoclast development and function*. *Nat Rev Genet*, 2003. **4**(8): p. 638-49.
237. Teitelbaum, S.L., *Osteoclasts and integrins*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1068**: p. 95-9.
238. Kearns, A.E., S. Khosla, and P.J. Kostenuik, *Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease*. *Endocr Rev*, 2008. **29**(2): p. 155-92.
239. Ikeda, T., et al., *Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus*. *Endocrinology*, 2001. **142**(4): p. 1419-26.
240. Fata, J.E., et al., *The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development*. *Cell*, 2000. **103**(1): p. 41-50.
241. Jones, D.H., et al., *Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL*. *Nature*, 2006. **440**(7084): p. 692-6.

242. Takayanagi, H., et al., *RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta*. Nature, 2002. **416**(6882): p. 744-9.
243. Takayanagi, H., et al., *T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma*. Nature, 2000. **408**(6812): p. 600-5.
244. Chen, G., et al., *Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation*. Cancer, 2006. **107**(2): p. 289-98.
245. Li, Y., et al., *B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo*. Blood, 2007. **109**(9): p. 3839-48.
246. Hofbauer, L.C. and M. Schoppet, *Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases*. JAMA, 2004. **292**(4): p. 490-5.
247. Theoleyre, S., et al., *The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(6): p. 457-75.
248. Whyte, M.P., et al., *Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease*. N Engl J Med, 2002. **347**(3): p. 175-84.
249. Kong, Y.Y., et al., *OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis*. Nature, 1999. **397**(6717): p. 315-23.
250. Padalecki, S.S., et al., *Chromosome 18 suppresses prostate cancer metastases*. Urol Oncol, 2003. **21**(5): p. 366-73.

251. Bord, S., et al., *Mechanisms by which high-dose estrogen therapy produces anabolic skeletal effects in postmenopausal women: role of locally produced growth factors*. Bone, 2001. **29**(3): p. 216-22.
252. Guise, T.A. and G.R. Mundy, *Cancer and bone*. Endocr Rev, 1998. **19**(1): p. 18-54.
253. Bubendorf, L., et al., *Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients*. Hum Pathol, 2000. **31**(5): p. 578-83.
254. Clarke, N.W., J. McClure, and N.J. George, *Preferential preservation of bone mineralisation by LHRH agonists in the treatment of metastatic prostate cancer*. Eur Urol, 1991. **19**(2): p. 114-7.
255. Nemoto, R., et al., *Serum pyridinoline crosslinks as markers of tumour-induced bone resorption*. Br J Urol, 1997. **80**(2): p. 274-80.
256. Zhang, X., et al., *Prostatic neoplasia in transgenic mice with prostate-directed overexpression of the c-myc oncoprotein*. Prostate, 2000. **43**(4): p. 278-85.
257. Lynch, C.C., et al., *MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL*. Cancer Cell, 2005. **7**(5): p. 485-96.
258. Moseley, J.M., et al., *Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(14): p. 5048-52.
259. Liao, J., et al., *Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis*. Cancer Res, 2006. **66**(18): p. 9065-73.



260. Iddon, J., et al., *Expression of parathyroid hormone-related protein and its receptor in bone metastases from prostate cancer*. J Pathol, 2000. **191**(2): p. 170-4.
261. Hofbauer, L.C., A. Neubauer, and A.E. Heufelder, *Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases*. Cancer, 2001. **92**(3): p. 460-70.
262. Brown, J.M., et al., *Osteoprotegerin and rank ligand expression in prostate cancer*. Urology, 2001. **57**(4): p. 611-6.
263. Brown, J.M., et al., *Serum osteoprotegerin levels are increased in patients with advanced prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(10): p. 2977-83.
264. Yang, J., et al., *Prostate cancer cells induce osteoblast differentiation through a Cbfa1-dependent pathway*. Cancer Res, 2001. **61**(14): p. 5652-9.
265. Steiner, M.S., G.S. Wand, and E.R. Barrack, *Effects of transforming growth factor beta 1 on the adenylyl cyclase-cAMP pathway in prostate cancer*. Growth Factors, 1994. **11**(4): p. 283-90.
266. Hughes, F.J., et al., *The effects of bone morphogenetic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells in vitro*. Endocrinology, 1995. **136**(6): p. 2671-7.
267. Bentley, H., et al., *Expression of bone morphogenetic proteins in human prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia*. Br J Cancer, 1992. **66**(6): p. 1159-63.

268. Thomas, R., et al., *Placental bone morphogenetic protein (PLAB) gene expression in normal, pre-malignant and malignant human prostate: relation to tumor development and progression*. *Int J Cancer*, 2001. **93**(1): p. 47-52.
269. Feeley, B.T., et al., *Overexpression of noggin inhibits BMP-mediated growth of osteolytic prostate cancer lesions*. *Bone*, 2006. **38**(2): p. 154-66.
270. Kanety, H., et al., *Increased insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) gene expression and protein production lead to high IGFBP-2 content in malignant ovarian cyst fluid*. *Br J Cancer*, 1996. **73**(9): p. 1069-73.
271. Harman, S.M., et al., *Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-3, and prostate-specific antigen as predictors of clinical prostate cancer*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(11): p. 4258-65.
272. Cohen, P., et al., *Transfection of the human insulin-like growth factor binding protein-3 gene into Balb/c fibroblasts inhibits cellular growth*. *Mol Endocrinol*, 1993. **7**(3): p. 380-6.
273. Nakamoto, T., et al., *Basic fibroblast growth factor in human prostate cancer cells*. *Cancer Res*, 1992. **52**(3): p. 571-7.
274. Granchi, S., et al., *Endothelin-1 production by prostate cancer cell lines is up-regulated by factors involved in cancer progression and down-regulated by androgens*. *Prostate*, 2001. **49**(4): p. 267-77.
275. Nelson, J.B., et al., *Endothelin-1 inhibits apoptosis in prostate cancer*. *Neoplasia*, 2005. **7**(7): p. 631-7.

276. Frauscher, F., et al., *Comparison of contrast enhanced color Doppler targeted biopsy with conventional systematic biopsy: impact on prostate cancer detection.* J Urol, 2002. **167**(4): p. 1648-52.
277. Magnusson, P., et al., *Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone.* J Bone Miner Res, 1999. **14**(11): p. 1926-33.
278. Yorio, M.A., et al., *Alkaline phosphatase isoenzymes for the diagnosis of metastatic tumors and lymphomas of liver and bone.* Medicina (B Aires), 2000. **60**(3): p. 311-5.
279. Koeneman, K.S., et al., *Osteocalcin-directed gene therapy for prostate-cancer bone metastasis.* World J Urol, 2000. **18**(2): p. 102-10.
280. Epstein, S., *Serum and urinary markers of bone remodeling: assessment of bone turnover.* Endocr Rev, 1988. **9**(4): p. 437-49.
281. Parfitt, A.M., et al., *Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with Iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase.* J Bone Miner Res, 1987. **2**(5): p. 427-36.
282. Eastell, R., et al., *The effect of age on bone collagen turnover as assessed by pyridinium crosslinks and procollagen I C-terminal peptide.* Osteoporos Int, 1993. **3 Suppl 1**: p. 100-1.
283. Cross, N.A., et al., *Calcium homeostasis and bone metabolism during pregnancy, lactation, and postweaning: a longitudinal study.* Am J Clin Nutr, 1995. **61**(3): p. 514-23.
284. Yam, L.T., *Clinical significance of the human acid phosphatases: a review.* Am J Med, 1974. **56**(5): p. 604-16.

285. Romas, N.A., N.R. Rose, and M. Tannenbaum, *Acid phosphatase: new developments*. Hum Pathol, 1979. **10**(5): p. 501-12.
286. Zenger, S., et al., *Differential expression of tartrate-resistant acid phosphatase isoforms 5a and 5b by tumor and stromal cells in human metastatic bone disease*. Clin Exp Metastasis, 2011. **28**(1): p. 65-73.
287. Watts, N.B., *Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling*. Clin Chem, 1999. **45**(8 Pt 2): p. 1359-68.
288. Fohr, B., C.R. Dunstan, and M.J. Seibel, *Clinical review 165: Markers of bone remodeling in metastatic bone disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(11): p. 5059-75.
289. Delmas, P.D., et al., *Urinary excretion of pyridinoline crosslinks correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients with vertebral osteoporosis*. J Bone Miner Res, 1991. **6**(6): p. 639-44.
290. Saad, F., R. Markus, and C. Goessl, *Targeting the receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK) ligand in prostate cancer bone metastases*. BJU Int, 2008. **101**(9): p. 1071-5.
291. Demers, L.M., et al., *Biochemical markers of bone turnover in patients with metastatic bone disease*. Clin Chem, 1995. **41**(10): p. 1489-94.
292. Brown, J.E., et al., *Bone resorption predicts for skeletal complications in metastatic bone disease*. Br J Cancer, 2003. **89**(11): p. 2031-7.
293. Saad, F., J.A. Eastham, and M.R. Smith, *Biochemical markers of bone turnover and clinical outcomes in men with prostate cancer*. Urol Oncol, 2010.
294. Lipton, A., et al., *Normalization of bone markers is associated with improved survival in patients with bone metastases from solid tumors*

- and elevated bone resorption receiving zoledronic acid. Cancer, 2008. 113(1): p. 193-201.*
295. Smith, M.R., et al., *Denosumab and bone-metastasis-free survival in men with castration-resistant prostate cancer: results of a phase 3, randomised, placebo-controlled trial. Lancet, 2012. 379(9810): p. 39-46.*
296. Soloway, M., et al., *Stratification of patients with metastatic prostate cancer based on extent of disease on initial bone scan. Cancer, 1988. 61(1): p. 195-202.*
297. D'Amico, A.V., et al., *Combination of the preoperative PSA level, biopsy gleason score, percentage of positive biopsies, and MRI T-stage to predict early PSA failure in men with clinically localized prostate cancer. Urology, 2000. 55(4): p. 572-7.*
298. Vermeulen, P.B., et al., *Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. Eur J Cancer, 1996. 32A(14): p. 2474-84.*
299. McClelland, R.A., et al., *Automated quantitation of immunocytochemically localized estrogen receptors in human breast cancer. Cancer Res, 1990. 50(12): p. 3545-50.*
300. Pertschuk, L.P., et al., *Immunohistologic localization of estrogen receptors in breast cancer with monoclonal antibodies. Correlation with biochemistry and clinical endocrine response. Cancer, 1985. 55(7): p. 1513-8.*
301. Shimada, A., et al., *Immunocytochemical staining of estrogen receptor in paraffin sections of human breast cancer by use of monoclonal*

- antibody: comparison with that in frozen sections.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(14): p. 4803-7.
302. Wilbur, D.C., et al., *Estrogen and progesterone receptor detection in archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue from breast carcinoma: a comparison of immunohistochemistry with the dextran-coated charcoal assay.* Mod Pathol, 1992. **5**(1): p. 79-84.
303. Monge, M., et al., *Subtractive proteomic approach to the endometrial carcinoma invasion front.* J Proteome Res, 2009. **8**(10): p. 4676-84.
304. Clines, G.A. and T.A. Guise, *Molecular mechanisms and treatment of bone metastasis.* Expert Rev Mol Med, 2008. **10**: p. e7.
305. Nelson, J.B., et al., *Phase 3, randomized, controlled trial of atrasentan in patients with nonmetastatic, hormone-refractory prostate cancer.* Cancer, 2008. **113**(9): p. 2478-87.
306. Mundy, G.R., *Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 584-93.
307. Giuliani, N., et al., *Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease.* Blood, 2002. **100**(13): p. 4615-21.
308. Zhang, J., et al., *In vivo real-time imaging of TGF-beta-induced transcriptional activation of the RANK ligand gene promoter in intraosseous prostate cancer.* Prostate, 2004. **59**(4): p. 360-9.
309. Mikami, S., et al., *Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas.* J Pathol, 2009. **218**(4): p. 530-9.

310. Sasaki, A., et al., *Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) expression in hepatocellular carcinoma with bone metastasis*. Ann Surg Oncol, 2007. **14**(3): p. 1191-9.
311. Bowsher, R.R. and J.M. Sailstad, *Insights in the application of research-grade diagnostic kits for biomarker assessments in support of clinical drug development: bioanalysis of circulating concentrations of soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand*. J Pharm Biomed Anal, 2008. **48**(5): p. 1282-9.
312. Kitazawa, S. and R. Kitazawa, *RANK ligand is a prerequisite for cancer-associated osteolytic lesions*. J Pathol, 2002. **198**(2): p. 228-36.
313. Rucci, N., et al., *Receptor activator of NF-kappaB ligand enhances breast cancer-induced osteolytic lesions through upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147*. Cancer Res, 2010. **70**(15): p. 6150-60.
314. Tometsko M, J.J., Miller R, Roudier M, Dougall W, Chaisson-Blake M, *Efficacy of RANKL inhibitor, OPG-Fc relative to zoledronic acid to inhibit bone metastasis of a RANK-expressing human breast cancer cell line*, IX th International Meeting on Cancer Induced Bone Disease, 2009 Oct 28-31, Arlington VA 2009.
315. Fili, S., M. Karalaki, and B. Schaller, *Mechanism of bone metastasis: the role of osteoprotegerin and of the host-tissue microenvironment-related survival factors*. Cancer Lett, 2009. **283**(1): p. 10-9.
316. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, *Osteoclast differentiation and activation*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 337-42.

317. Bekker, P.J., et al., *A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women*. J Bone Miner Res, 2004. **19**(7): p. 1059-66.
318. Body, J.J., et al., *A study of the biological receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand inhibitor, denosumab, in patients with multiple myeloma or bone metastases from breast cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(4): p. 1221-8.
319. Cummings, S.R., et al., *Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis*. N Engl J Med, 2009. **361**(8): p. 756-65.
320. Lipton, A., et al., *Randomized active-controlled phase II study of denosumab efficacy and safety in patients with breast cancer-related bone metastases*. J Clin Oncol, 2007. **25**(28): p. 4431-7.
321. Fizazi, K., et al., *Randomized phase II trial of denosumab in patients with bone metastases from prostate cancer, breast cancer, or other neoplasms after intravenous bisphosphonates*. J Clin Oncol, 2009. **27**(10): p. 1564-71.
322. Ellis, G.K., et al., *Effect of denosumab on bone mineral density in women receiving adjuvant aromatase inhibitors for non-metastatic breast cancer: subgroup analyses of a phase 3 study*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **118**(1): p. 81-7.
323. Stopeck, A.T., et al., *Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study*. J Clin Oncol, 2010. **28**(35): p. 5132-9.



324. Fizazi, K., et al., *Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study*. Lancet, 2011. **377**(9768): p. 813-22.
325. Henry, D.H., et al., *Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2011. **29**(9): p. 1125-32.
326. Smith, M.R., et al., *Denosumab in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(8): p. 745-55.
327. Coleman, R.E., et al., *Predictive value of bone resorption and formation markers in cancer patients with bone metastases receiving the bisphosphonate zoledronic acid*. J Clin Oncol, 2005. **23**(22): p. 4925-35.
328. Smith M, S.F., Shore N, Oudard S, Miller K, Tombal B, Sieber P, Fizazi K, Van Veldhuizen P, Damiao R, Marx G, Morote J, Feng A, Dansey R, Goessl C, *Denosumab delays development of multiple bone metastases in men with castrate-resistant prostate cancer*. American Urological Association Meeting, Atlanta May 2012.
329. Saad F, S.M., Shore N, Oudard S, Miller K et al., *Effect of denosumab on prolonging bone-metastasis free survival (BMFS) in men with nonmetastatic castrate-resistant prostate cancer (CRPC) presenting with aggressive PSA kinetics.*, ASCO Chicago 2012.
330. Pérez-Martínez, F.C., et al., *Immunohistochemical analysis of low-grade and high-grade prostate carcinoma: relative changes of parathyroid hormone-related protein and its parathyroid hormone 1*

*receptor, osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kB ligand.* J Clin Pathol, 2007. **60**(3): p. 290-4.

331. Lessard, L., et al., *NF-kappa B nuclear localization and its prognostic significance in prostate cancer.* BJU Int, 2003. **91**(4): p. 417-20.

332. Santini, D., et al., *Receptor activator of NF-kB (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients.* PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19234.