

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

ESTUDIO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL
ENDOTELIO VASCULAR (VEFG) Y DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO BÁSICO (bFGA) EN LA
PATOLOGÍA BENIGNA Y MALIGNA DE LA PRÓSTATA

VICENTE RODRIGO GUANTER

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 20 de Setembre de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Antoni Gelabert Más
- D. Francisco Javier Romero Fernández
- D^a. Rosalía Carrón de la Calle
- D. Fernando Aguiló Lucía
- D. Manuel Gil Salom

Va ser dirigida per:

D. Francisco Clar Blanch

D. Carlos San Juan De La Orden

©Copyright: Servei de Publicacions
Vicente Rodrigo Guanter

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6355-8

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT  VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

DEPARTAMENT DE CIRURGIA

**ESTUDIO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO
VASCULAR (VEGF) Y DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
FIBROBLÁSTICO BÁSICO (bFGF) EN LA PATOLOGÍA
BENIGNA Y MALIGNA DE LA PRÓSTATA**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Vicente Rodrigo Guanter

Dirigida por:

Dr. D. Francisco Clar Blanch

Dr. D. Carlos San Juan de Laorden

Valencia, 2005

D. Francisco Clar Blanch, doctor en Medicina y Cirugía. Facultativo Especialista de Urología del Hospital de la Ribera, Alzira (Valencia).

D. Carlos San Juan de Laorden, doctor en Medicina y Cirugía. Profesor asociado del Departamento de Cirugía de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València y Jefe del Servicio de Urología del Hospital Universitario Dr. Peset. Valencia.

CERTIFICAN:

Que D. **Vicente Rodrigo Guanter**, licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección, en el Servicio de Urología del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia, el trabajo de Tesis Doctoral titulado *“Estudio del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) en la patología benigna y maligna de la próstata”*, y reúne las condiciones necesarias para ser presentado y defendido públicamente ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Valencia, 6 de Mayo de 2005

Fdo. Dr. D. Francisco Clar Blanch

Fdo. Dr. D. Carlos San Juan de Laorden

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, Doctor D. Francisco Clar Blanch y Doctor D. Carlos San Juan de Laorden, por sus enseñanzas a lo largo de mi formación como urólogo y por su estímulo y paciencia en la elaboración de esta Tesis.

Al Doctor D. Ismael Llorca Escuín por su ayuda en el trabajo de laboratorio.

Al Doctor D. Daniel Bautista Rentero por su ayuda en el estudio estadístico.

A todos los miembros del Servicio de Urología del Hospital Universitario Dr. Peset.

A Begoña

A mis padres y hermanas

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

aa: aminoácidos	HUVEC: células endoteliales de cordón umbilical humano
ADN: ácido desoxiribonucleico	ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1
aFGF: factor de crecimiento fibroblástico ácido	IGF: factor de crecimiento insulín-like
AFP: alfa fetoproteína	IL-1: interleuquina 1
AhR: aryl hidrocarbon receptor	IM: intramuscular
AIGF: factor de crecimiento inducido por andrógenos	JNK: c-Jun N-terminal protein kinase
AR: receptor androgénico	kb: kilobases
ARE: elementos de respuesta androgénica	K_d: constante de disociación
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	kDa: kilo daltons
ARNT: aryl hidrocarbon nuclear translocator	KDR: kinase-insert domain containing receptor
ARR: elementos de respuesta androgénica débiles	KGF: factor de crecimiento de queratinocitos
bFGF: factor de crecimiento fibroblástico básico	KLK: gen de la calicreína
bHLHPAS: proteínas “basic helix-loop-helix PAS”	LNCaP: líneas celulares de cáncer de próstata
BPSA: antígeno prostático específico “benigno”	MAM: meprimina
CSF: factor de crecimiento de colonias hematopoyéticas	mg: miligramo
d: dalton	ml: mililitro
DHT: 5- α -dihidrotestosterona	mm: milímetro
dl: decilitro	MMP: metaloproteinasas
EGF: factor de crecimiento epidérmico	NFAT: factor nuclear de células T activadas
ELISA: enzyme linked immunoabsorbent assay	ng: nanogramo
eNOS: sintasa endotelial del óxido nítrico	nm: nanómetro
ERK: extracellular signalregulated kinases	NO: óxido nítrico
FAK: cinasa de adhesión focal	NP: neuropilinas
FGF: factor de crecimiento fibroblástico	O₂: oxígeno
FGF-BP: proteína ligadora del factor de crecimiento fibroblástico	p: valor de significación estadística
FGFR: receptor de FGF	PAP: fosfatasa ácida prostática
Flk-1: fetal liver kinase 1	PD-ECGF: factor de crecimiento de células endoteliales derivado de las plaquetas
Flt-1: fms-like tyrosine kinase 1	PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas
HBP: hiperplasia benigna de próstata	PF4: factor plaquetario 4
HCG: gonadotropina coriónica humana	pg: picogramo
HIF1: factor 1 inducible por hipoxia	PGE₂: prostaglandina E ₂
hK: calicreína humana	PI3K/Akt: vía antiapoptótica inositol 3 cinasa Akt
HRE: elemento de respuesta a la hipoxia	PIGF: factor de crecimiento placentario

PIN: neoplasia intraepitelial prostática

PKC: proteína cinasa C

PLC γ : fosfolipasa C gamma

pO₂: presión parcial de oxígeno

PSA: antígeno prostático específico

PSA-ACT: complejo antígeno prostático específico- α 1antiquimiotripsina

PSAc: isoforma compleja del antígeno prostático específico

PSAd: densidad del antígeno prostático específico

PSADT: antígeno prostático específico “doubling time”

PSAL: antígeno prostático específico libre

PSAT: densidad del antígeno prostático específico de la zona transicional

PSAv: velocidad del antígeno prostático específico

pVHL: proteína *Von Hippel-Lindau*

ROC: receiver operating characteristic

rpm: revoluciones por minuto

Stat: signal transducers and activators of transcription

TAC: tomografía axial computerizada

TGF- α : factor de crecimiento transformante α

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

TSH: hormona tiroestimulante

VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

VEGFR1: receptor 1 de VEGF

VPF: factor de permeabilidad vascular

XIAP: x-chromosome linked inhibitor of apoptosis

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Marcadores tumorales	4
1.1.1. Marcadores tumorales en las enfermedades prostáticas	6
1.2. Antígeno prostático específico (PSA)	10
1.2.1. Características bioquímicas y regulación de su expresión	10
1.2.2. Síntesis	13
1.2.3. PSA: hiperplasia benigna de próstata y cáncer de próstata	17
1.3. Angiogénesis y cáncer	24
1.4. Factores de crecimiento	32
1.5. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	39
1.5.1. Funciones biológicas	40
1.5.1.1. Efectos biológicos en las células endoteliales	40
1.5.1.1.1. Supervivencia y anti-apoptosis	41
1.5.1.1.2. Proliferación	42
1.5.1.1.3. Migración	42
1.5.1.1.4. Producción de óxido nítrico (NO)	43
1.5.1.1.5. Regulación génica. Expresión de proteínas y otros factores	44
1.5.1.2. Angiogénesis	44
1.5.1.2.1. Vasculogénesis y angiogénesis fisiológica	44
1.5.1.2.2. Angiogénesis patológica	45
1.5.1.3. Permeabilidad vascular	46
1.5.1.4. Vasodilatación	49
1.5.1.5. Otras funciones	50
1.5.2. Organización del gen y propiedades de las isoformas de VEGF	51
1.5.3. Regulación de la expresión de VEGF	54
1.5.3.1. Hipoxia	55
1.5.3.2. Factor inducible por hipoxia-1 (HIF1)	56
1.5.3.3. Hormonas y citoquinas	57
1.5.3.4. Diferenciación y transformación celular	57

1.5.4. Receptores de VEGF	59
1.5.4.1. Receptores tirosin cinasa VEGFR1 y VEGFR2	59
1.5.4.2. Neuropilinas (NP)	62
1.5.5. VEGF y cáncer	64
1.6. Familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF).....	66
1.6.1. Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF).....	68
1.6.1.1. Estructura del gen y funciones	68
1.6.1.2. Actividades biológicas.....	73
1.6.1.2.1. Angiogénesis y cicatrización de las heridas.....	73
1.6.1.2.2. Desarrollo embrionario y organogénesis	74
1.6.2. Receptores de FGF (FGFR): Estructura y función.....	75
1.6.3. Secreción y función paracrina de bFGF	77
1.6.4. Hiperplasia benigna de próstata y FGF	79
1.6.5. Cáncer de próstata y FGF	81
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	84
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	88
3.1. Datos generales	89
3.2. Seguimiento	90
3.3. Técnica de ecografía y biopsia.....	90
3.4. Determinación de los niveles séricos de PSA	91
3.5. Determinación de los niveles séricos de VEGF.....	91
3.6. Determinación de los niveles urinarios de bFGF.....	92
3.7. Estudio estadístico	93
4. RESULTADOS.....	94
4.1. Descripción general de los grupos	95
4.2. Resultados en los grupos de estudio.....	95
4.3. Relaciones entre variables.....	109

4.3.1. Relación entre PSA y grado de Gleason, estadio, presencia de metástasis y éxitus	109
4.3.2. Relación entre estadio clínico, presencia de metástasis y éxitus.....	110
4.3.3. Relación entre Gleason y metástasis	111
4.3.4. Relación entre niveles séricos de VEGF y grado de Gleason, estadio clínico, presencia de metástasis, edad, niveles séricos de PSA y éxitus	112
4.3.5 Relación entre niveles urinarios de bFGF, grado de Gleason, estadio clínico, presencia de metástasis, edad, niveles séricos de PSA y éxitus	114
4.3.6. Curva ROC del PSA para ambos grupos de estudio	116
4.3.7. Curva ROC del PSA para la presencia de metástasis.....	117
4.3.8. Curvas ROC de VEGF y bFGF para ambos grupos de estudio	118
4.3.9. Curvas ROC de VEGF y bFGF para la presencia de metástasis.....	120
4.3.10. Estudio de la supervivencia	122
5. DISCUSIÓN	124
6. CONCLUSIONES	134
7. BIBLIOGRAFÍA	136

1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de marcadores que faciliten el diagnóstico precoz de una determinada enfermedad o monitoricen la respuesta terapéutica es un objetivo hasta el momento insuficientemente alcanzado.

El cáncer es un fenómeno biológico que se caracteriza por presentar a lo largo de su evolución continuos cambios en su activa y heterogénea población celular, de tal manera que ciertos clones celulares son sustituidos por otros que, adaptándose a las influencias externas, confieren al tumor sus peculiares características.

Este hecho, unido a la dificultad para conocer con exactitud el estadio del tumor en un momento determinado y a la existencia de un periodo de latencia, es decir, el tiempo que transcurre desde que un tumor se inicia hasta que se manifiesta, hizo que numerosos investigadores centraran sus esfuerzos en la búsqueda de sustancias que fueran útiles en el diagnóstico y control evolutivo de los mismos.

Surge de esta manera la idea de los marcadores tumorales, que cristalizará a principios de los años sesenta como consecuencia de una serie de líneas de trabajo independientes entre sí⁽¹⁾.

En la patología tumoral es una necesidad largamente anhelada, que sólo en tumores testiculares de células germinales y en menor medida en cáncer de próstata reúnen determinados condicionantes con clara utilidad clínica. De ahí que constantemente se investiguen y valoren nuevas opciones, que en la mayoría de las ocasiones sólo comportan confusión e incremento de costes sanitarios.

El cáncer de próstata es la segunda causa más frecuente de muerte como consecuencia de enfermedad neoplásica en varones europeos y americanos⁽²⁻⁵⁾.

Actualmente no existe ningún marcador tumoral independiente que pueda predecir el comportamiento individual del cáncer de próstata o que pueda determinar la respuesta que el huésped va a ejercer contra la neoplasia. No es posible distinguir aquellos cánceres que tendrán importancia clínica y, en concreto, antes de que se produzca invasión local o metástasis a distancia⁽⁶⁾.

Es por tanto, importante conocer la historia natural, no sólo del cáncer de próstata sino también de los procesos benignos, en especial de la hiperplasia

benigna de próstata (HBP) y de los procesos biológicos y moleculares asociados con la patogénesis de estas enfermedades ⁽⁷⁾.

La utilización de marcadores tumorales en el cáncer de próstata se inició con la medición de los niveles de fosfatasa ácida en el suero y la introducción posterior de un radioinmunoensayo específico para determinar la fosfatasa ácida prostática (PAP). ⁽⁸⁾.

La búsqueda de un marcador tumoral más sensible y específico para el cáncer de próstata llevó al descubrimiento del antígeno prostático específico (PSA) ⁽⁹⁾.

Aunque el PSA es el mejor marcador que existe actualmente para el cáncer de próstata, no es perfecto. No es lo suficientemente específico para el cáncer de próstata y en muchas ocasiones el problema es diferenciar la HBP del carcinoma de próstata, ya que en ambos se pueden elevar los niveles de PSA sérico, existiendo cifras de solapamiento comunes a ambas patologías prostáticas ⁽¹⁰⁾. Esto significa que el PSA nos marcará pacientes sin cáncer (falsos positivos) y conducirá a la realización innecesaria de biopsias ^(11, 12).

La deficiente especificidad del PSA para distinguir entre varones con HBP y cáncer de próstata cuando el tacto rectal es normal y su concentración sérica inferior a 10,0 ng/ml es bien conocida ⁽¹³⁾. Además, cada vez parece más evidente que existe un número significativo de varones con cáncer de próstata que tienen concentraciones de PSA inferiores a 4,0 ng/ml (falsos negativos) ⁽¹⁴⁾.

Debido a esto, las ciencias básicas y la investigación clínica siguen buscando nuevas formas de incrementar la utilidad clínica de la prueba del PSA, bien reemplazando o complementando a éste.

Algunas de las líneas de investigación están centradas en la dependencia de los tumores para su crecimiento y progresión de la neoformación vascular o angiogénesis y concretamente en los factores reguladores de ésta.

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), en los que está basado este estudio, están reconocidos como dos de los más importantes factores de crecimiento angiogénicos ⁽¹⁵⁾.

1.1. MARCADORES TUMORALES

La meta de un programa de screening de cáncer es detectar tumores en un estadio lo suficientemente precoz para permitir instaurar un tratamiento eficaz. Además, los instrumentos de screening deben ser lo suficientemente económicos y no invasivos para permitir la extensa aplicación de los mismos.

Un marcador tumoral es una sustancia biológica producida y secretada por un tumor, no secretada por tejido no tumoral, detectable en líquidos corporales (sangre y orina), de estructura generalmente proteica, dotada o no de actividad biológica y que es útil para el diagnóstico, detección precoz, estadiaje, pronóstico y seguimiento tras el tratamiento de un determinado tipo de tumor ^(8, 9, 16).

Sin embargo, los marcadores tumorales pueden ser a veces más complicados y/o indirectos, abarcar, por ejemplo, medidas de respuesta inmune al desarrollo tumoral, cambios hormonales inducidos por el tumor o perfiles de espectrometría de masas de proteínas séricas ⁽¹⁾.

El cáncer es una enfermedad con una diversidad biológica importante y es improbable que un único marcador detecte todos los cánceres de un órgano en particular con una alta especificidad y sensibilidad.

Hay que destacar que mantener una alta especificidad (bajas tasas de falsos positivos) es una prioridad en los screenings de población. Incluso bajas tasas de falsos positivos se traducen en un importante número de pacientes sujetos a costosos procesos diagnósticos innecesarios y estrés psicológico.

De este modo, los marcadores tumorales precisan ser altamente específicos para el cáncer y el uso de varios marcadores tumorales será probablemente necesario para un programa de screening completo que sea sensible y específico a la vez ⁽¹²⁾.

Así pues, el marcador tumoral “ideal” debería de reunir una serie de características:

- ser sensible para identificar la presencia de un mínimo de células tumorales,
- ser específico de un determinado tipo de tumor,
- debe estar presente en los tumores,
- ser secretado *in vitro* por las células tumorales,

- ser fácilmente cuantificable y no presentar fluctuaciones en su concentración,
- ser detectable en líquidos corporales y extractos titulares,
- si esta presente en condiciones de normalidad, su concentración asociada a la malignidad será mayor,
- debe tener una vida media biológica corta,
- no debe ser influido por enfermedades benignas,
- seguir un curso paralelo a la evolución clínica de la neoplasia,
- asociarse a estados premalignos y alteraciones endocrinas relacionadas con tumores, actuando como indicador de riesgo,
- bajo coste económico ^(1, 17).

Sin embargo, es importante tener en cuenta algunas consideraciones generales sobre los marcadores tumorales utilizados en la actualidad ⁽¹⁸⁾:

- Ningún marcador sérico utilizado actualmente es específico de malignidad.
- Raramente los niveles séricos de los marcadores están elevados en fases precoces de la enfermedad. Los niveles altos suelen hallarse cuando los pacientes tienen la enfermedad diseminada.
- No hay ningún marcador tumoral absolutamente órgano específico.
- Aparte de posiblemente la gonadotropina coriónica humana (HCG) en el coriocarcinoma, ningún marcador se eleva en el 100% de los pacientes con un cáncer determinado.
- Los márgenes de referencia para los marcadores tumorales no están bien definidos y son usados sólo como guía. Un nivel inferior al rango de referencia no excluye malignidad mientras que concentraciones por encima del rango no significan necesariamente la presencia de cáncer. Las fluctuaciones de los niveles en el tiempo son probablemente más útiles clínicamente que el valor absoluto en un momento dado.
- Como en muchos marcadores tumorales no hay acuerdos de Referencias Internacionales de Preparaciones, diferentes kits de análisis pueden dar diferentes resultados sobre el mismo suero. Esta situación es aplicable particularmente para el PSA.

- Los laboratorios que realizan determinaciones de marcadores tumorales deberían indicar el método utilizado en sus informes.

1.1.1. MARCADORES TUMORALES EN LAS ENFERMEDADES PROSTÁTICAS

Los marcadores tumorales han contribuido a mejorar el conocimiento acerca de la historia natural de las neoplasias y evaluar con mayor precisión la eficacia de los distintos tratamientos.

El primer marcador para el cáncer de próstata fue la fosfatasa ácida, descrita por Gutman y Gutman en el año 1.938 ⁽⁸⁾.

En 1.941, Huggins y Hodges demostraron el papel fundamental de este enzima como marcador de la respuesta del tratamiento hormonal. Posteriormente Foti, Herschman y Cooper, introdujeron un radioinmunoensayo inmunológicamente específico para la determinación de la fosfatasa ácida prostática (PAP) ⁽⁸⁾.

La PAP ha servido como marcador biológico en el cáncer de próstata durante casi medio siglo. No obstante, la ubicuidad y heterogeneidad de este enzima complican su utilidad como marcador para el cáncer de próstata. El porcentaje de falsos negativos varía entre el 15 a 40% en pacientes con cáncer diseminado, dependiendo del método usado. También existen una serie de factores que condicionan una tasa muy alta de falsos positivos; entre ellos la gran dificultad para medir la PAP sérica evitando la interferencia de los isoenzimas 2 y 4 presentes en otros tejidos de modo anormal en ciertas circunstancias ⁽¹⁶⁾.

El descubrimiento del antígeno prostático específico (PSA) ha generado una gran actividad destinada a definir el uso de este marcador en las enfermedades prostáticas.

Fue descrito inicialmente por Hara et al. ⁽⁹⁾ en 1.971, denominándolo "gammaseminoproteína".

En 1.979 Wang et al. ⁽¹⁹⁾, lo aislaron en tejido prostático y demostraron que se trataba de un antígeno órgano específico al no encontrarlo en ningún otro tejido

humano. Confirmaron su presencia tanto en próstata normal como en hiperplásica y neoplásica, y lo denominaron antígeno prostático específico.

Posteriormente, se ha comprobado que no es prostático específico ya que se ha detectado en glándulas periuretrales en hombres y en mujeres, glándulas anales, glándulas sudoríparas apocrinas, tumores de mama apocrinos, neoplasias de glándulas salivales y recientemente en leche humana, aunque en el tejido prostático su producción es extremadamente mayor ⁽²⁰⁾.

En 1.980 Papsidero et al. ⁽²¹⁾, demostraron la presencia del PSA en el suero de hombres con cáncer de próstata.

En 1.981 Wang et al. ⁽²²⁾, lo describen como marcador tumoral del cáncer de próstata, al confirmar que su titulación aumenta significativamente en el cáncer de próstata.

En la actualidad el PSA es el marcador más ampliamente utilizado en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata. Se trata de una glucoproteína sintetizada en el epitelio ductal y acinis prostáticos. Se encuentra en tejido prostático normal, hiperplásico, tumoral y metastásico. Es secretado a la luz de los ductos prostáticos para transformarse en componente del plasma seminal y alcanza el suero después de difundir a través del estroma y membrana basal.

La función del PSA es la licuefacción del coágulo seminal, provocando una mayor movilidad de los espermatozoides ⁽²³⁾.

El PSA se ha constituido en piedra angular dentro del diagnóstico diferencial de la patología prostática, por tanto hay que estar familiarizado con el empleo e interpretación de este examen complementario.

Sin embargo, muchos pacientes con HBP tienen niveles aumentados de PSA sérico, y entre ellos habrá algunos que tengan una neoplasia intraepitelial prostática (PIN) o carcinoma oculto de próstata ⁽²⁴⁾.

Cuando el valor del PSA es menor de 4,0 ng/ml la prevalencia del cáncer prostático es de sólo 1.4%, y de 53.3% cuando el PSA está por encima de 10,0 ng/ml. La falta de especificidad de este marcador es más evidente en los pacientes con valores de PSA situados en el rango entre 4,1 y 10,0 ng/ml. Para superar este problema se han ido introduciendo nuevos conceptos relacionados con el PSA como: densidad del PSA (PSAd) o índice de PSA, velocidad del cambio de PSA

(PSAv), grado de glicosilación del PSA, PSA libre (PSAL), relación PSA libre / PSA total.

Por tanto, a pesar de ser el mejor marcador disponible actualmente para el cáncer de próstata, no es perfecto ya que no es un marcador tumor-específico.

Actualmente no existe ningún marcador que sea ideal en todos los contextos; el rendimiento de los diferentes marcadores depende de aspectos específicos de cada tipo de tumor, como la prevalencia, la heterogeneidad tumoral y la respuesta al tratamiento⁽²⁵⁾.

Los avances técnicos en biología molecular están permitiendo establecer nuevas estrategias para la obtención de marcadores tumorales, lo que constituye un campo de investigación que está evolucionando muy rápidamente⁽⁸⁾. Por esto los centros de investigación buscan nuevos marcadores que reemplacen o complementen al PSA, con la intención de discriminar con exactitud los procesos benignos y malignos de la próstata.

Una de estas sustancias son los factores de crecimiento. Son proteínas originadas por la activación de protooncogenes, que contribuyen y regulan el normal crecimiento y diferenciación celular así como su muerte (apoptosis). Estas proteínas también contribuyen a la transformación neoplásica celular, ya sea de forma directa o por la acción de sus receptores. No son específicos de ningún órgano ni elemento celular, por lo que un mismo factor de crecimiento puede ser detectado en tejidos diversos con acción estimulante o inhibidora según el caso^(26, 27).

El común denominador de todas las investigaciones actuales es la necesidad de mejorar los tests diagnósticos. Probablemente la utilidad diagnóstica aumenta con la adición de otros “marcadores”. En la patología prostática en particular, hay una gran necesidad de mejorarlos para la detección precoz de cánceres de próstata órgano-confinados, que es cuando puede aplicarse un tratamiento efectivo.

La necesidad de utilizar múltiples marcadores refleja la naturaleza multidimensional de la enfermedad prostática que abarca desde el cáncer metastático hasta el cáncer asintomático, la hiperplasia benigna de próstata y los procesos inflamatorios de la misma⁽²⁸⁾.

No es extraño que, dada la heterogeneidad del cáncer de próstata, un único marcador no pueda satisfacer completamente las necesidades clínicas diagnósticas.

1.2. ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO (PSA)

1.2.1. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y REGULACIÓN DE SU EXPRESIÓN

La molécula del PSA es una glucoproteína de cadena única compuesta por 237 aminoácidos (aa). Su peso molecular es de 28.430 daltons (d), incluyendo la parte de carbohidrato unida al aspartato en la posición 45.

El gen que codifica el PSA se localiza en el brazo largo del cromosoma 19 y tiene un tamaño aproximado de 6 kilobases (kb), estando formado por 4 intrones y 5 exones^(9, 23). Este gen se ha denominado KLK3.

El PSA es miembro de la familia de la calicreína humana tisular, localizada en el cromosoma 19q13.4^(29, 30). La familia de la calicreína humana, codifica PSA (calicreína hK3), hK2, hK4 y hK15 (prostín), así como otras proteasas de la serina⁽³¹⁾.

Inicialmente las calicreínas humanas fueron definidas como proteasas de la serina que digerían ciertas proteínas de alto peso molecular para liberar péptidos bioactivos llamados cininas. Actualmente están divididas en dos familias, las *calicreínas plasmáticas* y las *tisulares*^(29, 31).

La *calicreína plasmática* humana del cromosoma 4 (también denominada factor Fletcher o KLKB1) es producida exclusivamente en el hígado y no está relacionada con las calicreínas tisulares.

Entre las *calicreínas tisulares* el único enzima con actividad es la calicreína humana tipo 1 (hK1; calicreína pancreática/renal)^(29, 32). Esta calicreína es una proteína de 238 aa producida en las glándulas salivales, páncreas y riñón y, aunque no es producida en la próstata, comparte una homología del 62% con el PSA.

Hasta hace poco, estaban identificadas sólo tres calicreínas humanas tisulares: hK1, hK2 (calicreína glandular) y hK3 (PSA). Sin embargo, técnicas de clonación del ácido desoxiribonucleico (ADN) y de secuenciación del genoma humano han revelado un total de 15 genes de calicreínas tisulares localizados en el cromosoma 19q13.3-q13.4, los cuales están todos codificados por cinco exones de tamaño similar y poseen entre un 40% y un 80% de secuencia homóloga^(31, 33).

El gen que codifica hK1 (KLK1) está próximo al centrómero y se sigue de KLK15, KLK3 (codifica PSA) y KLK2⁽²⁹⁾ (Figura 1).

Los genes de las calicreínas se expresan en muchos tejidos y muchos están regulados por hormonas esteroideas.

Además del PSA, hK2 y hK4 parecen expresarse primariamente en la próstata y están reguladas por andrógenos. La estrecha relación entre KLK2, KLK3 y KLK4, junto con su expresión primaria en próstata, indican que los elementos reguladores próstata-específicos comunes (además de los elementos regulados por andrógenos) pueden controlar su expresión.

Hay estudios que indican que hK2 y posiblemente hK4, aunque hK4 se expresa con niveles mucho más bajos, pueden ser útiles como marcadores del cáncer de próstata⁽³⁴⁾.

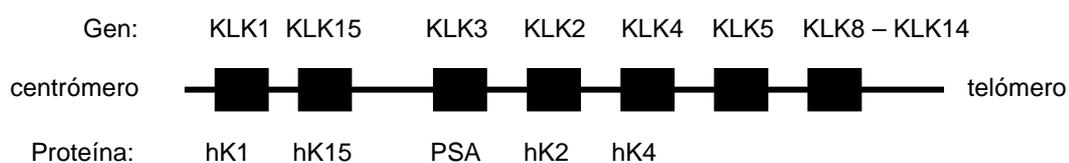


Figura 1: Mapa del locus de las calicreínas humanas tisulares. Se indica el nombre del gen y de las correspondientes proteínas.

La transcripción del PSA está regulada positivamente por un receptor androgénico (AR) y el PSA ha sido estudiado como un modelo de gen regulado por andrógenos⁽²⁹⁾.

El AR es un receptor de hormona esteroidea que se une como un homodímero a secuencias específicas de ADN, llamadas elementos de respuesta androgénica (ARE), y hay una zona denominada consenso de estos ARE localizada en las posiciones 156 a 170 desde el sitio de inicio de la transcripción del gen del PSA⁽³⁵⁾.

El AR también puede unirse débilmente a sitios diferentes a los de unión fuerte del consenso y han sido identificados en los sitios 365 a 400 del gen y se han denominado elementos de respuesta androgénica débiles (ARR).

Hay estudios que han caracterizado la región responsable del alto nivel de expresión de PSA andrógeno-estimulada en un fragmento de unos 450 pares de bases, localizados aproximadamente 4,2 kb hacia arriba del sitio de inicio de la transcripción, denominado PSA distal realzado (Figura 2). Esta región contiene una única zona de consenso fuerte ARE denominada ARE III, pero estudios han demostrado la existencia de múltiples zonas adicionales débiles de no consenso. La unión cooperativa de múltiples AR a esta región parece tener importancia en su fuerte actividad andrógeno-dependiente ⁽²⁹⁾.

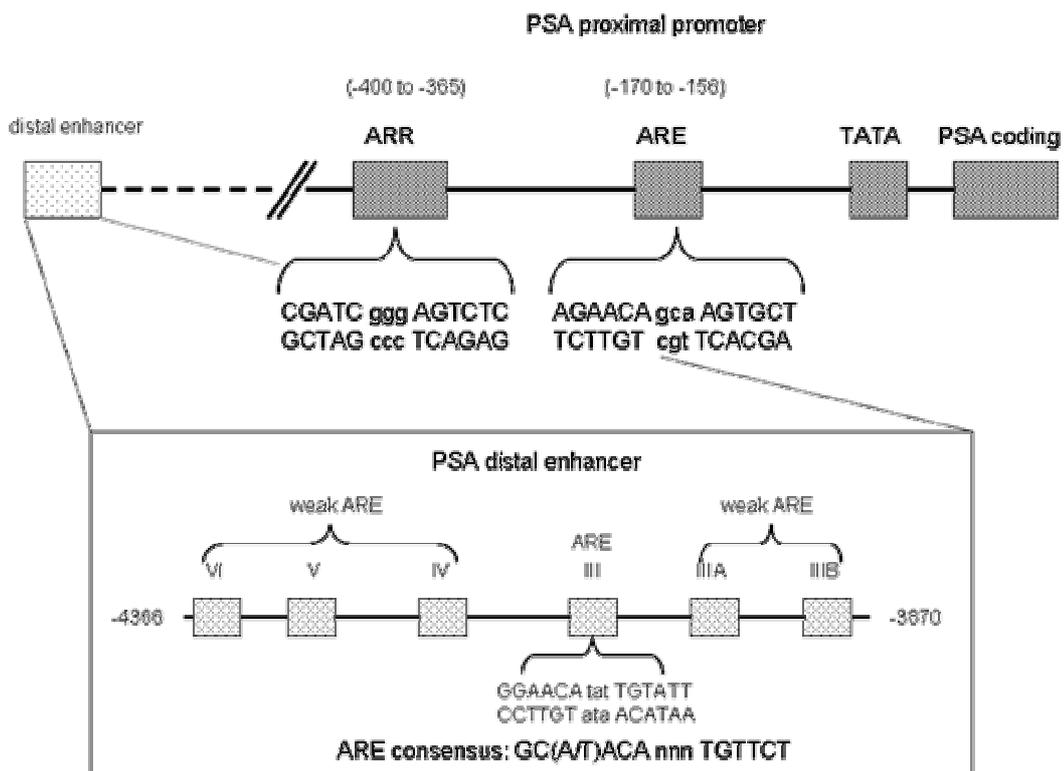


Figura 2: Regiones principales de la regulación de la expresión del gen del PSA. Tomado de Balk SP, Ko Y-J, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. J Clin Oncol 2003; 21(2): 383-391.

El PSA se expresa consistentemente en el cáncer de próstata aunque su nivel de expresión por célula básica es menor que en el epitelio de la próstata normal ⁽³⁶⁾. Esta expresión refleja la actividad transcripcional de los receptores androgénicos en la mayoría de cánceres de próstata, aunque se han identificado factores adicionales en la regulación del promotor del PSA ⁽³⁷⁾.

Es importante conocer que, aunque la disminución de los niveles de PSA como respuesta a la deprivación androgénica es sin duda causada en parte por muerte de células tumorales, es también el resultado de la disminución de la producción de PSA estimulado por receptores androgénicos (AR) por las células tumorales supervivientes. Como resultado, las terapias de deprivación androgénica pueden en algunos casos tener mayores efectos en la producción de PSA que en la supervivencia tumoral. En particular, el bloqueo androgénico completo por combinación de castración y tratamiento con antagonistas de receptores androgénicos versus castración sólo resulta en una más rápida disminución de PSA y niveles nadir más bajos, pero esto no se traduce en un aumento significativo de la supervivencia ⁽³⁸⁾.

Por lo tanto, aunque la proporción y magnitud de la declinación del PSA es predictivo de la respuesta clínica en pacientes que reciben el mismo tratamiento, deben usarse cautelosamente cuando se comparan terapias diferentes ⁽²⁹⁾.

1.2.2. SÍNTESIS

El PSA es sintetizado con una secuencia en su inicio de 17 aa (preproPSA) que es cortada cotranslacionalmente para generar una proteína precursora inactiva de 244 aa (proPSA).

El corte de 7 aa en el extremo N-terminal de la molécula de proPSA genera el enzima activo (PSA), la cual tiene cinco puentes disulfuro, una cadena única de oligosacáridos unidos a asparagina y una masa de 28,4 kDa ^(29, 39).

Este clivaje del proPSA habitualmente se produce entre la arginina en la posición 7 y la isoleucina en la posición 8, quedando la isoleucina en la posición N-terminal de la proteína madura activa. Este sitio puede ser fácilmente digerido por

tripsina, pero *in vivo* es hK2 el principal enzima activador, el cual tiene una acción tripsina-like y se expresa predominantemente por el epitelio secretor prostático.

El PSA puede ser activado por otras calicreínas incluida la prostasa (hK4).

Aproximadamente el 30% del PSA del plasma seminal es enzima intacto y activo proteolíticamente y un 5% forma complejos con la proteína C inhibidora.

Otras formas adicionales son inactivas por los clivajes internos (presumiblemente por proteasas en el fluido seminal) entre los residuos 85 a 86, 145 a 146 o 183. Estas isoformas de PSA se han denominado PSA “benigno” o BPSA, se han identificado en la zona de transición prostática y se han encontrado aumentadas en la HBP⁽⁴⁰⁾. Es importante señalar que su concentración está disminuida en tejido de cáncer de próstata, probablemente por la disminución a la exposición a proteasas en el fluido seminal⁽⁴¹⁾.

Una forma adicional encontrada en tejido de cáncer de próstata es una forma truncada de proPSA clivada entre isoleucina 5 y serina 6. El resultado es denominado [-2]proPSA, tiene 2 aa extras respecto al PSA activo y es catalíticamente inactivo (por lo tanto circula como PSA libre). Se ha visto por estudios inmunohistoquímicos usando anticuerpos monoclonales que [-2]proPSA está aumentado en las secreciones de glándulas prostáticas malignas⁽⁴⁰⁾.

Se han identificado más isoformas de proPSA truncados con una, cuatro o cinco aa extras en el extremo N-terminal y también se han hallado elevados en tejido de cáncer de próstata. Las bases moleculares de la elevación de estas isoformas no están aclaradas pero probablemente reflejen la disminución de clivajes de proPSA por hK2 en el tejido prostático canceroso. Estas isoformas pueden encontrarse en sangre periférica y se están investigando como marcadores del cáncer de próstata⁽⁴⁰⁾.

El PSA se sintetiza en el epitelio ductal y en los acinis prostáticos, y se localiza en el interior de la célula en gránulos y vesículas citoplásmicas, en el retículo endoplásmico rugoso, en vacuolas y gránulos de secreción, y en cuerpos densos lisosomales⁽⁴²⁾. Se encuentra en tejido prostático normal, hiperplásico, tumoral primario y tumoral metastático de la próstata.

Se segrega hacia la luz de los conductos prostáticos mediante exocitosis y se convierte en un componente del plasma seminal, alcanzando el suero tras su

difusión desde las células lumbales a través de la membrana basal epitelial y del estroma prostático, pudiendo atravesar la membrana basal capilar y las células epiteliales e introducirse en los linfáticos.

El PSA se introduce en el fluido seminal cuando éste atraviesa la glándula prostática. En el líquido seminal existen proteínas formadoras de gel, principalmente semenogelinas I y II y fibronectina, que son producidas por las vesículas seminales. Estas proteínas son los principales constituyentes del coágulo seminal que se forma en la eyaculación y que actúa atrapando los espermatozoides. El PSA actúa produciendo la licuefacción del coágulo seminal mediante proteólisis de las proteínas formadoras de gel en fragmentos más pequeños y solubles, liberando de esta forma los espermatozoides ^(9, 29).

A pesar de las suposiciones iniciales en el sentido de que el PSA era un antígeno con especificidad tisular y especificidad de sexo, los métodos inmunohistoquímicos y de inmunoensayo han permitido detectar la presencia de PSA en diversos tejidos y estructuras de la mujer y el hombre como las glándulas periuretrales, las glándulas anales, las glándulas sudoríparas apocrinas, los carcinomas apocrinos de mama, los tumores de glándulas salivales y en la leche procedente de la mama femenina. Teniendo en cuenta la existencia de elementos sensibles a los andrógenos en las regiones promotoras del gen codificador del PSA y en los tejidos glandulares en los que se ha demostrado la presencia del PSA, la existencia de PSA en tejidos distintos de la próstata puede reflejar respuestas de órganos terminales a los esteroides circulantes ⁽⁴³⁾.

Como se ha descrito anteriormente el PSA es secretado en el fluido seminal y sólo una pequeña parte en la sangre. Sin embargo, cuando se pierde la arquitectura normal del tejido por el cáncer aumenta su entrada en sangre y puede incluso ser activamente secretado a la circulación ⁽⁴⁴⁾. De todas formas, a nivel tisular la expresión de PSA es menor que en tejido normal. La elevada concentración en suero en el cáncer es debida al incremento en el acceso a la circulación del mismo. Para llegar a la circulación desde las células prostáticas normales el PSA ha tenido que filtrarse a través del espacio extracelular donde está sujeto a su degradación ⁽⁴⁴⁾.

El 70-90% de PSA que entra en sangre periférica está intacto y circula como un complejo de 80 a 90 kDa con el inhibidor de la proteasa α 1-antitripsina

(PSA-ACT). Cantidades menores forman complejos con otros inhibidores de las proteasas como α 2-macroglobulina y α 1-antitripsina.

Los anticuerpos, en la mayoría de técnicas reconocen el PSA libre y la mayoría de complejos de PSA, pero no reconocen el complejo con α 2-macroglobulina cuando éste está rodeando completamente a la proteína.

El PSA que en sangre periférica es inactivo lo es porque los clivajes internos en los residuos 85 a 86, 145 a 146 o 182 a 183 no forman complejos con inhibidores de las proteasas u otras proteínas y circulan como PSA libre (PSAL), comprendiendo el 10 al 30% del PSA total. Como se ha señalado anteriormente estos clivajes internos ocurren en el plasma seminal y están presentes en niveles bajos en tejido de cáncer de próstata, probablemente por la disrupción de la secreción normal del PSA en los ductos. Consecuentemente, la relación de PSAL / PSA total es más bajo en muchos pacientes con cáncer de próstata y parece ayudar en la discriminación entre condiciones normales y cáncer de próstata.

La proteína precursora proPSA y las formas truncadas de proPSA pueden ser identificadas en suero. Un estudio relaciona un pequeño número de pacientes con biopsia positiva para cáncer de próstata y un PSA total entre 6,0 y 24,0 ng/mL, encontrando que [-2]proPSA comprende una alta fracción del PSAL (25% al 95%), el cual fue mayor que en pacientes con biopsia negativa. Hacen falta más estudios para aclarar si esta forma truncada de proPSA puede aumentar la especificidad del test del PSA ^(29, 40).

La vida media del PSA total es de aproximadamente 3 días, lo que corresponde a la vida media del complejo PSA-ACT. La vida media del PSAL es de aproximadamente 18 a 22 horas ⁽⁴⁰⁾.

1.2.3. PSA: HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA Y CÁNCER DE PRÓSTATA

Hay una variedad de factores preanalíticos y clínicos que deberían ser considerados a la hora de interpretar un valor de PSA.

Cada laboratorio debería mencionar el método utilizado en su informe (existen más de ochenta métodos disponibles en la actualidad en Europa) y unos valores de referencia específicos para el método utilizado ^(45, 46). En la tabla 1 se muestran algunos kits comerciales para la determinación de PSA total con su correspondiente sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

PSA assay	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV %	NPV %
Abbott IMx	87	59	40	93
Bayer ACS:180	90	63	42	96
Bayer IMMUNO-1	83	61	40	92
Biodata MAIAclone	88	59	42	93
BYK-Sangtec LIAMat	91	41	42	95
CIS ELSA-2	90	62	43	95
DPC Immulite	91	62	45	95
DPC IRMAcount	88	61	44	94
DPC Milenia ELISA	90	57	41	94
Hybritech TANDEM-E	91	58	42	95
Hybritech TANDEM-R	88	61	44	94
Roche COBAScore	90	61	42	95
Roche Enzymun	83	70	48	93
Wallac DELFIA EQM	81	59	42	93
Wallac DELFIA Prostatus	90	57	39	95

Tabla 1: Algunos kits comerciales disponibles para la determinación de PSA total.

Otros factores que pueden influir en el resultado, además del volumen prostático son: biopsia y resección transuretral de próstata, retención urinaria aguda, prostatitis aguda, infarto prostático y eyaculación ⁽⁴⁷⁾.

El tacto rectal no influye de forma suficiente sobre la concentración de PSA como para alterar las decisiones terapéuticas. Aunque se produce un incremento

leve en el nivel de PSA tras el tacto rectal, este aumento no es clínicamente significativo. Sin embargo, un masaje prostático vigoroso puede influir de forma significativa sobre la concentración sérica de PSA; por tanto, es una medida prudente cuantificar el nivel sérico de PSA antes del masaje prostático, o bien esperar al menos tres días hasta que el PSA vuelva a sus niveles basales ^(45, 48).

Algunos fármacos como el finasteride pueden disminuir la concentración del PSA ⁽⁴⁵⁾.

Cuando el PSA se sintetiza su concentración es aproximadamente un millón de veces superior en los fluidos prostáticos que en suero. El PSA intraductal está separado del drenaje capilar y linfático de la próstata por una barrera natural constituida por una membrana basal y una capa de células basales epiteliales. Cuando alguna enfermedad interfiere con esta barrera o células malignas invaden los espacios intersticiales, el flujo de PSA a la circulación eleva los niveles de éste en la misma.

Por otra parte, el PSA es sintetizado tanto por células benignas como malignas. Hay un incremento gradual del PSA durante la progresión desde el estado benigno al maligno. Consecuentemente hay una superposición considerable en las concentraciones séricas de PSA, por lo que las mediciones de niveles absolutos de PSA no tienen, en ocasiones, la suficiente exactitud para distinguir entre pacientes con HBP y cáncer de próstata ^(45, 49).

Además, un número significativo de pacientes con cáncer de próstata tienen valores de PSA normales (0,0 – 4,0 ng/ml). Por lo tanto, queda poco claro qué concentraciones de PSA medidas en pacientes con síntomas de prostatismo y diagnóstico de presunción de HBP pueden enmascarar aquellos casos con cáncer de próstata no conocidos previamente al tratamiento de la HBP. Esta cuestión es todavía aún más importante en pacientes con cáncer de próstata clínicamente órgano-confinado que podrían beneficiarse de una detección y tratamiento precoces del cáncer.

Wolff y cols. ⁽⁴⁹⁾ revisaron los niveles séricos de PSA en pacientes con HBP y cáncer de próstata órgano-confinado y observaron que aunque hay una concentración estadísticamente significativa mayor en los pacientes con cáncer de próstata órgano-confinado que en los pacientes con HBP existe un considerable

solapamiento de los valores sobre todo en los pacientes del grupo con PSA entre 4,1 y 10,0 ng/ml.

Cuando el PSA tiene un valor entre 4,1 y 10,0 ng/ml se pueden superponer los pacientes con HBP y con cáncer próstata, siendo muy difícil establecer el diagnóstico diferencial. Se estima que del 20 al 30% de estos pacientes pueden tener un cáncer de próstata, por lo que la mayoría de veces se opta por la realización de una biopsia prostática para establecer el diagnóstico.

Sin embargo, con esta metodología son muchos los pacientes sin cáncer de próstata a los que se les realizan biopsias prostáticas, lo que supone un estrés psicológico para el paciente, un riesgo de complicaciones por ser invasiva, una sobrecarga asistencial para los servicios de urología y un coste económico para la sanidad. El hallazgo de valores “anormales” puede causar una ansiedad significativa en pacientes sanos sin la enfermedad, Klotz L.⁽⁵⁰⁾ propuso el término de PSAdinia para esta circunstancia⁽⁵⁰⁾.

En estos pacientes, pues, con PSA entre 4,1 y 10,0 ng/ml hay que esforzarse en diferenciar mediante otros métodos diagnósticos aquellos con una alta probabilidad de tener un cáncer de próstata y, por tanto, tributarios de la biopsia prostática, de aquellos otros con una baja probabilidad de cáncer de próstata, en los que se evitaría ésta, realizando en ellos sólo seguimiento de los niveles de PSA. En la tabla 2 se muestra la probabilidad de padecer un cáncer de próstata en relación con el nivel de PSA en varones con tacto rectal normal⁽⁴⁵⁾:

PSA (ng/ml)	Probabilidad de cáncer de próstata (%)
< 2,5	Desconocido
2,5 – 4,0	10 – 20
4,1 – 10,0	25
> 10,0	50 - 60

Tabla 2: Probabilidad de cáncer de próstata en relación al nivel de PSA.

Estudios en autopsias revelan que la HBP es extremadamente frecuente en el varón, con un rápido incremento de la prevalencia que se inicia en la cuarta década de la vida y culmina en la novena década, cuando la prevalencia es casi del 100%. El incremento del cáncer de próstata es paralelo a la HBP pero con un inicio unos 15 años más tarde. El 80% de casos de cáncer de próstata se asocian a HBP y menos de un 20% aparecen sin HBP concomitante ⁽⁴⁹⁾.

El cáncer de próstata es uno de los principales problemas médicos de la población masculina. En la Unión Europea se estima que cada año se diagnostican más de 85.000 nuevos casos y esta enfermedad supone el 9% de todas las muertes por cáncer en varones ⁽⁴⁹⁾.

La frecuencia de cáncer de próstata no palpable aumenta con la edad. La mayoría de pacientes presentan enfermedad avanzada (localmente o a distancia) en el momento del diagnóstico. Aproximadamente en un 10% de intervenciones por HBP se detecta un cáncer de próstata. Algunos de estos cánceres detectados quirúrgicamente son tumores de alto grado y estadio (30%) e incurables en el momento de la detección. Otros son pequeños y bien diferenciados con una baja amenaza para la supervivencia del paciente ^(3,4).

Debido a las ventajas económicas, facilidad de realización y resultados objetivos se ha abogado por el PSA como un marcador tumoral para la detección precoz del cáncer de próstata. Sin embargo, en presencia de “pequeñas cantidades” de cáncer de próstata y “grandes cantidades” de HBP el PSA no puede distinguir entre ambas entidades. Para obviar estas limitaciones se han desarrollado estrategias que tiene como finalidad la reducción de biopsias innecesarias, especialmente en el intervalo de PSA entre 4,1 y 10,0 ng/ml ^(13, 45), y aumentar la especificidad del PSA como marcador tumoral.

En la tabla 3 se resumen los principales conceptos desarrollados para aumentar la especificidad del PSA:

CONCEPTO	PUBLICACIÓN ORIGINAL
<i>Estáticos</i>	
PSA densidad (PSAd)	Babaian et al. ⁽⁵¹⁾ ; Veneziano et al. ⁽⁵²⁾
PSA densidad de la zona de transición (PSAT)	Kalish et al. ⁽⁵³⁾
Valores de referencia específicos para la edad	Oesterling et al. ⁽⁵⁴⁾
Relación PSA libre – PSA total (PSAL/PSA)	Lilja et al. ⁽⁵⁵⁾ ; Stenman et al. ⁽⁵⁶⁾
Isoforma compleja del PSA (PSAc)	Allard et al. ⁽⁵⁷⁾
Isoenzimas del PSA libre	Huber et al. ⁽⁵⁸⁾
<i>Dinámicos</i>	
PSA velocidad (PSAv)	Carter et al. ⁽⁵⁹⁾
PSA doubling time (PSADT)	Schmid et al. ⁽⁶⁰⁾

Tabla 3: Conceptos para aumentar la especificidad del PSA.

La conjunción PSA – tacto rectal en hombres mayores de 50 años (o a partir de los 45 años en pacientes con historia familiar positiva) es recomendada por la mayoría de guías clínicas para la detección precoz del cáncer de próstata a condición de que el paciente esté bien informado de los potenciales beneficios y daños de la prueba y su expectativa de vida sea al menos de 10 años ^(45, 61-64). El valor umbral o de corte recomendado en general es de 4,0 ng/ml ⁽⁶¹⁻⁶⁴⁾.

Para optimizar los ratios de detección considerando la edad Oesterling et al.⁽⁵⁴⁾ establecieron las siguientes referencias para el PSA ajustado a la edad:

40 – 50 años: 2,5 ng/ml

50 – 60 años: 3,5 ng/ml

60 – 70 años: 4,5 ng/ml

> 70 años: 6,5 ng/ml

Actualmente, hay dos grandes ensayos clínicos randomizados a gran escala en curso en Europa (European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer; ERSPC) y en Estados Unidos (Prostate, Lung, Colorectal and Ovary cancer; PLCO) para averiguar qué screening de cáncer de próstata puede reducir la mortalidad enfermedad-específica.

Como la efectividad del screening con PSA no ha sido bien demostrada en estos estudios con dos algoritmos diferentes de screening (cada 4 años con punto de corte de 3,0 ng/ml, ERSPC; y screening anual con punto de corte de 4,0 ng/ml; PLCO) parece prematuro considerar puntos de corte de PSA más bajos para el screening en todos los varones asintomáticos⁽⁶⁵⁾.

Así pues, en general, el punto de corte de 4,0 ng/ml parece ser el que se aproxima de forma más cercana a la optimización de la sensibilidad y especificidad para el PSA total⁽⁵⁾.

Desafortunadamente, muchos de los pacientes con cáncer tienen un PSA sérico inferior. Si se disminuye el valor de corte, aumenta la sensibilidad y el valor predictivo negativo, detectando por lo tanto más neoplasias, pero la tasa de falsos positivos también aumenta, con el consiguiente incremento de los pacientes con HBP que serían sometidos a la ansiedad de un test positivo más la biopsia innecesaria.

Asiz y Barathur⁽⁶⁶⁾ realizaron un meta-análisis de varias series para calcular la probabilidad de encontrar cáncer de próstata en un paciente teniendo en cuenta su edad, PSA sérico y PSAd. El objetivo era optimizar la detección de cáncer (verdaderos positivos) y reducir al mínimo el número de biopsias innecesarias (falsos positivos). La población del análisis implica a hombres sanos mayores de 50

años (2.567), con HBP (798), cáncer de próstata confinado al órgano (482) y diseminado (353). La sensibilidad y especificidad cambian de acuerdo al valor de corte escogido. Para un valor de corte de 4,0 ng/ml la sensibilidad es de 57% para el cáncer confinado al órgano y 79% para el cáncer diseminado. Los falsos positivos aparecen en los pacientes sanos (8%) y con HBP (29%). Disminuyendo el corte a 3,0 ng/ml la sensibilidad para el cáncer confinado al órgano fue del 67% y del 85% para el cáncer diseminado. Los falsos positivos fueron del 14% en hombres sanos y 36% para aquellos con HBP.

La relación PSA/volumen prostático o PSAd no parece aportar beneficios como método de “screening”^(66, 67).

Actualmente, la determinación del porcentaje de PSA libre respecto al PSA total es el método más difundido y eficiente para incrementar la especificidad de este antígeno^(13, 68).

Últimamente la cuantificación sérica del PSAc (isoforma compleja del PSA) está emergiendo como una alternativa a la determinación de PSA total⁽¹³⁾ y aunque existen múltiples estudios⁽⁶⁹⁻⁸²⁾ los resultados son en ocasiones difícilmente comparables por seguir distintos criterios tanto en la selección de los pacientes como en la biopsia prostática y sistemática empleada. Sin embargo, se puede apreciar que el incremento de eficacia del PSAc no es espectacular y la especificidad en los estudios publicados no permite imaginar que el número de biopsias innecesarias sería asumible y que por ello su determinación evitaría la aplicación de otros métodos para incrementar la especificidad⁽¹³⁾.

En conclusión, el PSA sigue siendo el mejor marcador para el cáncer de próstata, sin embargo, su sensibilidad y especificidad son subóptimas. Además, el marcador es especialmente poco satisfactorio en los valores intermedios, donde la HBP y el cáncer de próstata frecuentemente coexisten. Está especialmente limitado en los pacientes con HBP con cáncer de próstata localizado, que serían subsidiarios de un tratamiento con intención curativa, y en los que un nivel de PSA elevado no necesariamente indica la existencia de un cáncer de próstata pero un nivel normal tampoco lo excluye⁽⁴⁹⁾.

1.3. ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER

En las últimas décadas ha habido un interés creciente por los investigadores en la observación de que el crecimiento tumoral y las metástasis se acompañan de una significativa formación de nuevos vasos sanguíneos, esto es, de angiogénesis.

En el adulto, el proceso de angiogénesis es normal en procesos como la menstruación y la reparación de las heridas. Cuando los vasos crecen fuera de control la angiogénesis se convierte en patológica y sostiene la progresión de muchas enfermedades neoplásicas y no neoplásicas⁽⁸³⁾.

Judah Folkman fue el pionero en la investigación de la angiogénesis y el que formuló la hipótesis de que los tumores son “angiogénesis dependientes”^(84, 85).

Hasta que el tumor alcanza un tamaño de 1 a 2 mm³ recibe todos los nutrientes y el oxígeno (O₂) por difusión simple⁽⁸⁶⁾. Una vez que el tumor alcanza tamaños clínicamente detectables necesita generar neovascularización para conseguir el aporte de nutrientes y O₂ necesarios para continuar su desarrollo.

En los experimentos llevados a cabo por Folkman et al.^(87, 88) en la década de los años 60 inoculando células tumorales en órganos aislados y perfundidos, se demostró que la ausencia de angiogénesis se asociaba a una restricción del crecimiento tumoral a pequeños esferoides de 1 mm³ o menos. Esta fue la primera vez que se consiguió que tumores viables crecieran como masas tridimensionales en un tejido sin neovascularización. Cuando se trasladaba el pequeño tumor al ratón del que provenía desarrollaba neovascularización, crecía y alcanzaba tamaños 1.000 veces superiores al obtenido en el órgano aislado⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾. A partir de estos estudios se formuló la hipótesis que el crecimiento tumoral es angiogénesis dependiente.

Estudios posteriores realizados en la década de los años 70 aportaron pruebas, la mayoría de carácter indirecto, de la veracidad de la hipótesis:

- El crecimiento tumoral en la córnea del conejo tiene lugar de manera muy lenta y lineal mientras ésta se mantiene avascular; tras la vascularización se aprecia un crecimiento exponencial de la población tumoral⁽⁹⁰⁾.
- Los tumores suspendidos en el humor acuoso de la cámara anterior del ojo del conejo permanecen viables y limitados en su crecimiento (1 mm³). Estos son

capaces de inducir neovascularización en los vasos del iris pero están demasiado distantes para ser invadidos por ellos. Una vez que el esferoide tumoral es implantado contiguamente a los vasos neoformados el tumor puede crecer 16.000 veces su volumen original en un plazo de dos semanas ⁽⁹¹⁾.

- Los tumores cultivados en el humor vítreo del ojo del conejo permanecen viables pero limitan su desarrollo a menos de 0,5 mm de diámetro durante al menos 100 días. Una vez el tumor alcanza la superficie de la retina se neovasculariza y en un plazo de dos semanas puede experimentar un crecimiento volumétrico 19.000 veces superior a su tamaño original ⁽⁹²⁾.
- Los retinoblastomas humanos que metastatizan al vítreo son viables, avasculares y de crecimiento limitado ⁽⁹³⁾.
- Los tumores implantados en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo tienen limitado su crecimiento durante la fase avascular pero crecen rápidamente una vez se vascularizan ⁽⁹⁴⁾.
- En las experiencias desarrolladas por Thompson et al. ⁽⁹⁵⁾ se apreció que las células neoplásicas inyectadas subcutáneamente desarrollaban tumores que se vascularizaban cuando alcanzaban un volumen de 0,4 mm³. Conforme aumentaba el tamaño tumoral los vasos eran envueltos por el tumor infiltrante y llegaban a ocupar el 1,5% del volumen tumoral. Esto implica un aumento de un 400% respecto a la densidad vascular normal del tejido celular subcutáneo.
- La fase vascular de los tumores de colon que aparecen espontáneamente en las ratas tras la administración de carcinógenos se puede subdividir a su vez en dos. En una etapa precoz (diámetro inferior a 3,5 mm) el tumor está alimentado por los capilares preexistentes del huésped que están dilatados y ensanchados. En una etapa posterior (diámetro superior a 5 mm) se aprecia una proliferación capilar para conseguir una densidad microvascular superior a la normal ⁽⁹⁶⁾.

Del mismo modo, más recientemente se han acumulado pruebas directas que demuestran que la neovascularización es necesaria para el crecimiento tumoral:

- Un inhibidor de la angiogénesis, el AGM-1470, un análogo sintético de la fumagilina, inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* pero no *in vitro* ⁽⁹⁷⁾.
- El factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) es un potente agente angiogénico y tiene la capacidad de inducir mitosis en las células endoteliales. Está producido por las células endoteliales, teniendo éstas, además, receptores para él ⁽⁹⁸⁾.
- En las experiencias llevadas a cabo por Gross et al. ⁽⁹⁹⁾ se apreció crecimiento tumoral de un cáncer de colon humano, cuyas células carecían de receptores afines para bFGF y para las que éste no fue mitógeno *in vitro*. Cuando fue implantado en un ratón desnudo, la inyección sistémica de bFGF estimuló un aumento en la densidad y ramificación de los vasos sanguíneos así como una duplicación del tamaño del tumor. Se demostró la existencia de receptores para bFGF en el endotelio vascular. Cuando el ratón portador del tumor recibió anticuerpos monoclonales contra bFGF el crecimiento tumoral se retardó de manera significativa. Esta experiencia mostró que los cambios en el crecimiento del lecho capilar de un tumor influyen de manera directa en el crecimiento tumoral.
- Las experiencias de Hori et al. ⁽¹⁰⁰⁾ demostraron la importancia de bFGF en la angiogénesis y la progresión tumoral. Realizaron una transfección de ADN complementario (ADNc) de bFGF humano a fibroblastos normales de ratón. Estos fibroblastos exportaban bFGF y eran potentes inductores de angiogénesis. Cuando eran implantados en ratones inducían grandes tumores de evolución letal. Se demostró que la angiogénesis estaba inducida principalmente por bFGF liberado por estos tumores al realizar una mutación lugar específica del bFGF de manera que dos serinas quedaran sustituidas por cisteínas de tal forma que el bFGF resultante fuera neutralizado por un anticuerpo específico que no tenía actividad sobre bFGF natural. Cuando se administraba el anticuerpo al ratón al que se le había injertado la neoplasia se apreció una significativa reducción en la neovascularización y en el volumen tumoral.

- Kim et al. ⁽¹⁰¹⁾ desarrollaron una experiencia similar inhibiendo la actividad de otro potente agente angiogénico, VEGF, con ayuda de un anticuerpo monoclonal específico contra éste. El anticuerpo fue administrado a ratones desnudos a los que se les había implantado líneas celulares de rhabdomiosarcoma, leiomiomasarcoma o glioblastoma multiforme de origen humano. En los ratones el crecimiento vascular se vió afectado (existiendo una menor densidad capilar tumoral que en ratones no tratados), apreciando reducciones tumorales, en ocasiones, superiores al 90%. La utilización del anticuerpo in vitro no tuvo efecto sobre la tasa de crecimiento en los cultivos celulares.

Así pues, la angiogénesis tumoral es el crecimiento de nuevos vasos hacia y desde dentro de un tumor. La neovascularización puede ser estimulada por factores liberados desde las células tumorales, células inflamatorias asociadas al tumor y/o desde la matriz extracelular. Además, se ha comprobado que la angiogénesis no sólo influye en el crecimiento tumoral sino también en las metástasis. La primera evidencia de que la intensidad de la angiogénesis en un tumor humano podría predecir la probabilidad de metástasis fue descrita en el melanoma ⁽¹⁰²⁾.

Datos clínicos y experimentales indican que la mayoría de tumores se inician sin actividad angiogénica. En algún momento algunas células van a expresar el fenotipo angiogénico. A veces, puede ocurrir incluso antes del desarrollo completo del tumor (por ejemplo, en estadios preneoplásicos o preinvasivos) y además aparece de forma independiente de otras actividades durante la oncogénesis.

Durante la *fase prevascular* del crecimiento tumoral en el tumor primario la actividad angiogénica está ausente o es insuficiente. El tumor es pequeño y el crecimiento de todo el tumor es lento y el tiempo de duplicación o doblaje puede ser de años. Pero esto no significa que las células proliferen lentamente, de hecho puede estar aumentada su actividad pero se encuentran en un estadio en el que la generación de nuevas células tumorales está equilibrada con la muerte de las mismas (apoptosis). En esta fase suele ser difícil identificar los tumores a no ser que estén situados en una superficie externa visible. La mayoría van a ser indetectables y sólo son visibles con microscopio.

En el caso de las micrometástasis de los tumores puede suceder lo mismo en esta fase que en el tumor primario. Este mecanismo ha sido avanzado como hipótesis para explicar la “latencia” de las metástasis ⁽¹⁰²⁾.

Una diferencia muy importante entre lesiones en fase prevascular y fase vascular es que en el primer caso la incidencia de muerte celular por apoptosis es mayor que en el segundo.

En la *fase vascular*, cuando aparece neovascularización, los tumores pueden entrar en una fase de crecimiento rápido, intensificación de la invasión e incremento del potencial metastásico. Además los tumores vascularizados son la causa principal de síntomas en pacientes con cáncer.

La neovascularización va a ser responsable de una serie de efectos en el crecimiento tumoral ⁽⁹⁸⁾:

- Efectos en la perfusión. La neovascularización permite un crecimiento tumoral rápido, porque temporalmente soluciona el problema de intercambio de nutrientes, O₂ y desechos.
- Efectos paracrin. Desde las células endoteliales se liberan factores de crecimiento que estimulan las células tumorales como por ejemplo bFGF, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factores de crecimiento insulín-like (IGF-1, IGF-2) y citoquinas como interleuquina (IL)-1, IL-6, IL-8, que pueden aumentar el crecimiento tumoral. Por otra parte las condiciones de hipoxia que aparecen en algunas zonas del tumor como consecuencia de la compresión vascular pueden aumentar la presencia de receptores endoteliales para péptidos angiogénicos específicos como VEGF.
- Incremento del potencial metastásico. Aumenta la población replicante de células tumorales. Esto incrementa la posibilidad de generación de variantes celulares metastásicas que produzcan los enzimas y factores de crecimiento apropiados para penetrar en un órgano diana y sobrevivir.
- Incremento de los síntomas asociado a la neovascularización. La neovascularización es la responsable de algunos síntomas nuevos que aparecen después que el tumor ha expresado su fenotipo angiogénico. Por ejemplo, la presencia de sangre en orina, esputo o entre periodos menstruales puede

significar la existencia de un tumor vascularizado en la vejiga, bronquios o cérvix. El edema es otro de las causas de síntomas relacionados con la angiogénesis, muchos de los síntomas iniciales de los tumores cerebrales son secundarios a un edema cerebral local y una filtración de proteínas desde los altamente permeables capilares sanguíneos neoformados. El dolor óseo en las metástasis del cáncer de próstata puede estar relacionado en parte con la neovascularización. Una variedad de síndromes paraneoplásicos como actividades hormonales inapropiadas, estados de hipercoagulación y caquexia son secundarios a la actividad biológica de péptidos liberados a la circulación desde los tumores vascularizados. En algunos tumores existen grandes áreas centrales que no pueden ser penetradas por contrastes radiopacos debido a la compresión vascular, una situación que es inusual en tumores en una fase prevascular. Por último, un efecto dañino de la neovascularización, además de los signos y síntomas patológicos, es el resultado del potencial para la rápida expansión de variantes celulares del tumor que pueden tener un elevado potencial metastásico, mayor capacidad de proliferación y mayores niveles de resistencia a fármacos.

Todos estos efectos de la neovascularización son importantes razones a considerar para el potencial beneficio de la terapia antiangiogénica.

Hay que añadir que la actividad angiogénica es heterogénea dentro del tumor. Pueden existir áreas con alta y con baja densidad microvascular dentro de un mismo tumor. Es decir, sólo un subgrupo de células adquieren la actividad angiogénica y los nuevos vasos formados aparentemente contribuyen al crecimiento de las células tumorales no angiogénicas ⁽⁹⁸⁾.

La angiogénesis está controlada por un grupo de sustancias conocidas como factores angiogénicos.

El inicio de la angiogénesis en los tumores depende de la expresión coordinada de varios factores, como son VEGF, bFGF, PDGF, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , angiogenina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante (TGF)- α y β , factor de crecimiento de células endoteliales derivado de las plaquetas (PD-ECGF) o timidina fosforilasa.

También existen una serie de potentes inhibidores de la angiogénesis como la angiostatina y la trombospondina.

La angiogénesis precisa de la dilatación vascular, salida al estroma vascular, migración y proliferación de la células endoteliales y la canalización de brotes endoteliales ⁽¹⁰³⁾.

El cáncer de próstata, como otros tipos de cánceres, aparece como un proceso de múltiples pasos a menudo progresando desde neoplasia intraepitelial de bajo grado a neoplasia intraepitelial de alto grado, avanzando a carcinoma focal y finalmente a carcinoma invasivo y producción de metástasis ⁽¹⁰⁴⁾. De todas formas, los mecanismos moleculares responsables de la progresión tumoral prostática son poco conocidos ^(105, 106).

Se han identificado muchas anormalidades genéticas en el cáncer de próstata como mutaciones en los cromosomas 6q, 7q, 8p, 10p/10q, 13q, 16q, 17q y 18q ^(106, 107). También inactivación de genes supresores tumorales como Rb, p53b, p16 y PTEN ^(108, 109), así como, expresión aberrante de varios oncogenes, incluyendo *ras*, *myc*, *c-sis* y *c-erbB2* ⁽¹¹⁰⁻¹¹²⁾.

Sin embargo, parece que no existe un patrón consistente de alteración de un único oncogen o gen supresor tumoral en el cáncer de próstata el cual se asocie de forma convincente a la iniciación o progresión de la enfermedad ^(113, 114). Además, la aparición y progresión de los tumores de próstata puede estar regulada por mecanismos epigenéticos ⁽¹¹⁵⁾. Probablemente el mejor conocimiento de estos cambios genéticos y epigenéticos facilitaría el desarrollo de estrategias preventivas y diagnósticas más racionales.

Hemos visto que un evento precoz e importante durante la progresión de muchos tumores es la inducción de la angiogénesis, la cual se reconoce como un prometedor indicador pronóstico y un objetivo para el tratamiento. Datos procedentes de modelos experimentales con ratones transgénicos así como del análisis de una gran variedad de tumores humanos sugieren que el cambio a un fenotipo angiogénico sucede relativamente pronto durante la fase premaligna del crecimiento tumoral ^(102, 116).

En el caso del cáncer de próstata es concebible que el paso a fenotipo angiogénico sea el paso necesario en la progresión de PIN y carcinomas focales a

carcinomas invasores. Varios estudios sugieren que la neovascularización es un requisito esencial en la progresión del cáncer de próstata a través de varios estadios patológicos ⁽¹¹⁷⁻¹¹⁹⁾. Se ha observado un aumento progresivo de la densidad microvascular por inmunohistoquímica a través de los estadios patológicos ^(120, 121). También se ha descrito que la densidad microvascular tiene importancia pronóstica y es un factor predictor independiente del estadio patológico y del potencial maligno del cáncer de próstata ^(120, 122).

Además en modelos animales se ha visto que el uso de inhibidores de la angiogénesis, como linomida y quinolina-3-carboxiamida, han sido efectivos contra el crecimiento del cáncer de próstata ⁽¹²³⁻¹²⁵⁾.

Hay muchos estudios sobre la expresión de factores proangiogénicos en el cáncer de próstata como VEGF, bFGF, PD-ECGF, IGF-1, IGF-2 y TGF- β ^(23, 126, 127). La “llave” reguladora del factor angiogénico en muchos tumores es VEGF ^(110, 128, 129), el cual es un potente mitógeno para las células endoteliales.

1.4. FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento fueron identificados inicialmente en el suero como elementos necesarios para el crecimiento de las células en cultivo, donde el crecimiento hace referencia a la expansión celular en número más que al incremento en tamaño celular.

Se ha comprobado que el suero es más necesario para permitir la replicación de los cultivos celulares que para su supervivencia y, como el plasma no tiene el mismo efecto, se asume que los factores relevantes son liberados de las plaquetas durante la formación del coágulo. Así, uno de los primeros factores identificados se denominó factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Poco a poco se han ido identificando nuevos factores y actualmente es posible hacer crecer ciertos tipos de células con unos factores de crecimiento específicos para éstas sin utilizar suero completo ⁽¹³⁰⁾.

Los diferentes factores de crecimiento son muy distintos en muchos aspectos, pero se ha observado que grupos de dos, tres o a menudo más producen un tipo similar de respuesta, y por esto los factores de crecimiento se agruparon en familias.

La mayoría de factores de crecimiento de una familia tienen moléculas con una estructura tridimensional parecida y se piensa que esta similitud significa que hay regiones químicas o físico-químicas en las moléculas que producen el efecto funcional y dan similitud a la acción de factores del mismo grupo familiar ⁽¹³⁰⁾.

El nombre asignado a los factores de crecimiento se debe más al efecto originariamente observado que a su familia o a otros efectos descubiertos posteriormente. Así, por ejemplo, se observó que dos factores actuaban en un experimento produciendo el crecimiento celular en el centro de un gel de agar sin ningún accesorio físico, condición que hasta el momento se creía necesaria para el crecimiento celular. Los factores que causaban la “transformación” de las células de esta forma fueron denominados factores de crecimiento transformantes α y β (TGF- α y TGF- β). Posteriormente ha quedado claro que ambos tienen propiedades distintas y están clasificados en familias completamente diferentes. Por lo tanto,

existe algo de confusión en relación a la nomenclatura de los factores de crecimiento.

Por otro lado, el crecimiento celular no está asociado necesariamente con neoplasia. Los factores de crecimiento son importantes en condiciones normales de salud, particularmente en la cicatrización, inflamación, en la respuesta inmune y por supuesto en la embriogénesis ⁽²⁶⁾.

Los factores de crecimiento no son específicos de ningún órgano ni elemento celular, por lo que un mismo factor de crecimiento puede ser detectado en tejidos diversos con acción diferente ⁽²⁶⁾.

Las familias de factores de crecimiento incluyen ⁽²⁷⁾:

- Familia del Epidermal Growth Factor o factor de crecimiento epidérmico (EGF): regulado por el oncogen c-erb B-2:
 - o EGF: factor de crecimiento epidérmico
 - o TGF- α : factor de crecimiento transformante α
 - o Anfiregulina
- Familia del Fibroblast Growth Factor o factor de crecimiento fibroblástico (FGF): regulado por el oncogen int-2:
 - o aFGF: factor de crecimiento fibroblástico ácido
 - o bFGF: factor de crecimiento fibroblástico básico
 - o FGF-3 a FGF-23
- Familia del Transforming Growth Factor o factor de crecimiento transformante (TGF):
 - o TGF- β 1
 - o TGF- β 2
- Familia del Insulin-like Growth Factor o factor de crecimiento insuline-like (IGF):
 - o IGF-I
 - o IGF-II
 - o Relaxina
- Otros factores de crecimiento:
 - o NGF: Nerve Growth Factor
 - o VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

- PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas
- CSF: factor de crecimiento de colonias hematopoyéticas
- PD-ECGF: factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas

La característica común a todos ellos es que son polipéptidos producidos localmente en pequeñas concentraciones y actúan, generalmente, de un modo autocrino en las células que los producen o de una manera paracrina en las células vecinas ⁽⁷⁾.

Diferentes factores de crecimiento pueden producirse por diferentes células en un tejido o por la misma célula bajo diferentes circunstancias. Otra característica común es que hay tendencia a que varios factores actúen limitando su liberación o la respuesta a su liberación y de ese modo controlen sus acciones ⁽¹³⁰⁾.

Los factores de crecimiento pueden actuar por tres vías distintas ^(7, 26):

- autocrina: estimulando a la propia célula que lo produce,
- paracrina: estimulando a las células de vecindad,
- endocrina: acción a distancia, a modo de efecto hormonal.

En la formación de la glándula prostática los factores de crecimiento tienen las siguientes acciones ⁽⁷⁾:

- En la primera etapa de la formación de la próstata, en el feto, los estrógenos maternos y los producidos por el propio feto estimulan la célula del estroma la cual, a su vez, al fabricar bFGF estimula la célula epitelial, de vecindad, y a la propia célula del estroma. Todo ello en presencia de andrógenos, como agente importante en la cadena de activación de los factores de crecimiento.
- En una segunda etapa denominada de próstata estable que abarca desde la adolescencia hasta llegar a la edad del adulto, el crecimiento de la próstata por las células epiteliales viene equilibrado por la acción inhibitoria sobre éstas de TGF- β 1, producido por las células del estroma.
- En la formación de la HBP intervienen asimismo los factores de crecimiento produciendo el denominado “redespertar” embrionario dado que se reproduce, al avanzar la edad, un desequilibrio estrógeno-andrógeno lo que estimula la célula del estroma con mayor producción de bFGF y por lo tanto con crecimiento del estroma (nódulos de la zona transicional) y este estroma a su vez, estimula el epitelio. El factor más importante es bFGF, al dar lugar a

estimulación del estroma de la zona transicional produciéndose nódulos estromales que son canalizados y habitados por acinis con células epiteliales en sus bordes. El grado de interacción entre TGF- β 1 y bFGF regula la variabilidad entre hiperplasia estromal y glandular ^(27, 131).

Hay evidencias acumuladas que apoyan la intervención de los factores de crecimiento en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata ⁽⁴⁾.

Los factores de crecimiento regulan el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis (muerte celular programada). Además de hormonas como los andrógenos, una colección de factores de crecimiento positivos y negativos controlan el balance entre la proliferación y la muerte celular en la próstata.

Varios productos de oncogenes que contribuyen a la proliferación neoplásica se ha encontrado que son homólogos de los factores de crecimiento, de los receptores de los factores de crecimiento o de las moléculas en las vías de transmisión de la señal de estos receptores.

Varias familias de factores de crecimiento han sido implicadas en el crecimiento normal y maligno de la próstata (Tabla 4) ^(111, 127, 132-159).

Los factores de crecimiento ejercen efectos autocrinos y paracrinos sobre las células epiteliales y del estroma e interactúan con otros factores y proteínas ligadoras para el control del crecimiento prostático (Figura 3) ⁽¹⁶⁰⁾.

La familia de IGF, EGF, TGF- α , la familia de FGF y los factores de crecimiento endoteliales (PDGF y VEGF) son los reguladores estimuladores principales de la proliferación en la próstata ⁽¹⁶⁰⁾.

La familia TGF- β es el principal regulador inhibidor de la proliferación que se opone a la acción estimuladora de los factores de crecimiento IGF-I, EGF, TGF- α , bFGF y el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) en el tejido normal ⁽¹⁶⁰⁾.

Los factores EGF y TGF- α tienen unos efectos autocrinos y paracrinos de crecimiento en el cáncer de próstata primario que se convierte fundamentalmente en autocrino conforme avanza y se desarrolla una enfermedad andrógeno independiente.

El polipéptido IGF-I está implicado en el desarrollo del cáncer de próstata y en la interacción de IGFBP-3 y su proteasa, el PSA, puede contribuir al crecimiento

continuo y desarrollo de metástasis óseas a través de la liberación local de IGF-I como resultado de un cambio de las isoformas del receptor ⁽¹³⁴⁾.

El factor bFGF puede actuar sobre las células epiteliales en el cáncer de próstata avanzado ⁽¹⁴⁸⁾.

El factor de crecimiento KGF controla el desarrollo la próstata normal por una vía paracrina pero la producción autocrina de KGF acompaña a la progresión del cáncer de próstata a la enfermedad andrógeno-independiente ⁽¹⁶¹⁾.

La importancia de los factores de crecimiento en la formación del tumor, progresión y metástasis en el cáncer de próstata conduce a intentar la modulación de los distintos niveles para obtener un beneficio terapéutico. El inhibidor de factores de crecimiento más ampliamente usado ha sido la suramina, la cual ha mostrado respuestas clínicas en los primeros ensayos clínicos ^(162, 163).

Se están evaluando anticuerpos antiVEGF en ensayos clínicos en fase I, con resultados preliminares que sugieren un pequeño beneficio clínico ⁽¹⁶⁴⁾.

Los receptores de los factores de crecimiento para EGF, IGF y FGF proporcionan potenciales dianas terapéuticas y son de particular interés ya que pueden activar de forma independiente el crecimiento celular y pueden interactuar con las vías de los receptores androgénicos.

El éxito de la aplicación de la terapia de factores de crecimiento en modelos *in vitro* se está trasladando cada vez más a ensayos clínicos y representa una apasionante nueva aproximación al tratamiento del cáncer de próstata ⁽⁴⁾.

De todas formas hay que indicar que el conocimiento actual del papel de los factores de crecimiento en la próstata surge de estudios sobre tejido humano y de modelos experimentales que intentan imitar el crecimiento prostático *in vitro* (líneas celulares) e *in vivo* (roedores). La medición de factores de crecimiento y sus receptores en tejido prostático humano ha producido resultados controvertidos y contradictorios. La heterogenicidad histológica que existe dentro del cáncer de próstata humano indica que el intento de correlacionar los niveles de factores de crecimiento con esta patología debe ser interpretado con precaución ⁽⁴⁾.

Factor de crecimiento	Célula de origen	Sitio diana	Papel en próstata normal	Papel en cáncer de próstata	Notas
IGF I	Estroma	IGF 1R en la superficie de la célula epitelial, secuestrado y degradado por IGF 2R	Acción paracrina sobre IGF 1R y sobre células epiteliales, promoviendo el crecimiento y diferenciación	Vía mitógena autocrina con expresión epitelial de IGF I, los niveles séricos de IGF I están aumentados en cáncer de próstata	Los niveles son controlados por proteínas de enlace- el clivaje de IGFBP 3 por PSA puede aumentar el crecimiento de células metastásicas
EGF	Epitelial (superficie luminal)	EGFR en la superficie basolateral de la célula epitelial	Regulación del crecimiento	La sobrerregulación de la expresión epitelial de EFG aumenta las metástasis y la invasión	Anticuerpos anti-EFGR inhiben el crecimiento de la célula tumoral
TGF- α	Estroma	EGFR en la superficie basolateral de la célula epitelial	Acción paracrina sobre EGFR epitelial para regular el crecimiento	Sobrerregulación de la expresión de TGF- α y producción epitelial autocrina	EGF y TGF- α se liberan bajo control de andrógenos
TGF- β	Estroma y músculo liso	T β RI y T β RII en la superficie de la célula epitelial	Induce apoptosis, efectos contrarios de EGF/TGF- α sobre las células epiteliales, aumenta el crecimiento de las células del estroma vía bFGF	Sobrerregulación de la expresión de TGF- β , aumenta la invasión y propagación metastásica en el cáncer	Niveles controlados por T β RIII, la pérdida de T β RI y T β RII confieren ventaja al crecimiento en las células tumorales
bFGF	Predominantemente del estroma (pequeña cantidad epitelial)	Receptor bFGF en células del estroma en próstata normal, también presentes en células epiteliales en el carcinoma	Regulación autocrina del crecimiento del estroma	Producción autocrina epitelial que aumenta las metástasis vía producción de matriz extracelular y angiogénesis	El receptor KGF permite respuesta a la producción autocrina de bFGF en el carcinoma
KGF	Estroma y epitelial	Receptor FGFR2 en las células epiteliales del carcinoma	Mediador paracrino de la acción de los andrógenos	Producción autocrina epitelial	La expresión autocrina acompaña a la progresión andrógeno independiente
PDGF	PDGFA desde el estroma y epitelio en el carcinoma	Receptor PDGF α en las células epiteliales del carcinoma	Baja expresión en tejido normal	Expresión de PDGFA y del receptor PDGF α aumentada en el carcinoma	Mayor PDGFA en tumores de bajo que de alto grado
VEGF	Epitelial	Superficie de células endoteliales	Papel incierto, hallazgos variables	Expresión de VEGF aumentada en el carcinoma	Inhibición de proliferación tumoral metastásica usando anticuerpos anti_VEGF

Tabla 4: Factores de crecimiento en la próstata normal y el cáncer de próstata ⁽⁴⁾.

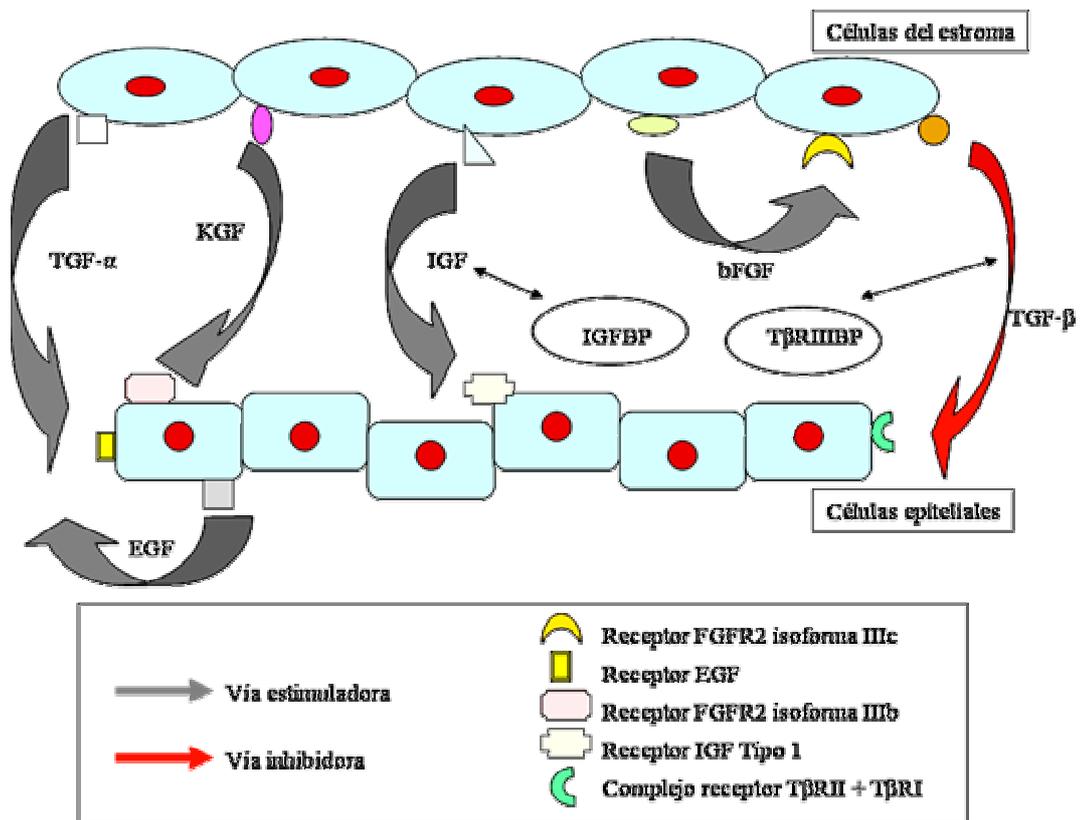


Figura 3: Factores de crecimiento y sus receptores implicados en el crecimiento prostático normal Adaptado de Hellowell GO, Brewster SF. Growth factors and their receptors in prostate cancer. BJU International 2002; 89: 230-240.

1.5. FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) fue descubierto en 1.983 por Senger et al. ⁽¹⁶⁵⁾. Este grupo describió la purificación parcial de una proteína que causaba permeabilidad vascular tras su inyección en la piel de cobayas. Debido a esta propiedad el factor fue llamado factor de permeabilidad vascular (VPF) y se creyó que su principal función era regular de manera específica la permeabilidad de la vascularización tumoral.

En 1.989 Ferrara y Ploüet ^(166, 167), de manera independiente, describieron el descubrimiento de una sustancia mitógena específica para células endoteliales a la que llamaron, respectivamente, factor de crecimiento endotelial vascular y vasculotropina.

El clonaje y la expresión de VEGF y VPF revelaron que estas dos moléculas eran en realidad la misma ^(168, 169).

A lo largo de los últimos años han sido identificados otros miembros de la familia de VEGF, que incluye el factor de crecimiento placentario (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y EG-VEGF ^(170, 171) así como sus receptores (VEGF-R1 o Flt-1, VEGF-R2 o Flk-1/KDR y VEGF-R3 o Flt-4) con actividad tirosín cinasa y co-receptores (neuropilinas) ⁽¹⁷²⁾.

La nomenclatura de estos miembros más recientes ha hecho que el primer factor descubierto se denomine VEGF-A, aunque en la mayoría de trabajos, así como en esta tesis, simplemente se le denomina VEGF.

La vasculotropina o VEGF es una glucoproteína básica homodimérica de 34 – 46 kDa ^(173, 174), ligadora de heparina, formada por polipéptidos con extremo N terminal idénticos unidos por puentes disulfuro que es secretada y expresada por múltiples células tumorales de origen humano y animal ⁽¹⁷⁵⁾ incluyendo entre otros carcinomas vesicales, renales y prostáticos ^(171, 176), carcinomas pulmonares ⁽¹⁷⁷⁾, angiosarcomas ⁽¹⁷⁸⁾, tumores intracraneales ⁽¹⁷⁹⁻¹⁸¹⁾, tumores tiroideos ⁽¹⁸²⁾, tumores ováricos ⁽¹⁸³⁾ y de cérvix uterino ⁽¹⁸⁴⁾, neoplasias mamarias ⁽¹⁸⁵⁾, tumores del tracto gastrointestinal ⁽¹⁸⁶⁾ y por células no tumorales como macrófagos activados ⁽¹⁸⁷⁾,

queratinocitos⁽¹⁸⁸⁾, células mesangiales y glomérulos renales⁽¹⁸⁹⁾, hepatocitos⁽¹⁹⁰⁾, células musculares lisas⁽¹⁹¹⁾, células de Leydig y de la corteza suprarrenal⁽¹⁹²⁾.

Tiene múltiples efectos específicos sobre las células endoteliales vasculares, incluyendo el incremento de su proliferación, migración y permeabilidad vascular^(166, 175, 193).

Se cree que tiene un papel crítico en la regulación de la angiogénesis⁽¹⁷³⁾.

Su expresión está regulada por varios factores de crecimiento y citoquinas, incluyendo IL-1, IL-6 PDGF, EGF, IGF-1, pero probablemente sea la hipoxia tisular el estímulo más potente de VEGF *in vivo*^(194, 195) ya que la expresión de VEGF es mucho mayor en regiones de tumores adyacentes a zonas avasculares de necrosis⁽¹⁷⁴⁾.

1.5.1. FUNCIONES BIOLÓGICAS

VEGF es una citoquina multifuncional que ejerce la mayoría de sus funciones en el endotelio vascular. Entre estas funciones se encuentran ser el principal inductor de angiogénesis, promover permeabilidad vascular, actuar como vasodilatador, y otras funciones que se detallan a continuación.

1.5.1.1. Efectos biológicos en células endoteliales

Las células endoteliales constituyen la diana preferencial de VEGF para la mayoría de sus efectos biológicos^(196, 197). En estas células, VEGF actúa como factor de supervivencia y como inhibidor de la apoptosis, es un potente mitógeno, induce migración y cambia la expresión génica dando lugar al aumento de expresión de diferentes proteínas como las metaloproteasas, proteínas implicadas en la vía fibrinolítica, o la sintasa endotelial del óxido nítrico (eNOS).

Los cambios que causa VEGF en las células endoteliales están implicados en su acción como promotor de angiogénesis, de permeabilidad vascular o como agente vasodilatador.

1.5.1.1.1. Supervivencia y anti-apoptosis

VEGF es un factor de supervivencia para células endoteliales *in vitro* e *in vivo*. La eliminación de VEGF causa regresión de la vascularización en diversas condiciones fisiológicas y patológicas. Se ha postulado que el recubrimiento por pericitos es el factor crítico que determina la dependencia de las células endoteliales por VEGF ⁽¹⁹⁸⁾.

Un mecanismo importante mediante el cual VEGF promueve supervivencia en células endoteliales es la activación de la vía antiapoptótica fosfatidil inositol 3 cinasa/Akt (PI3K/Akt) ⁽¹⁹⁹⁾. La activación de esta vía causa la inhibición de la apoptosis a través de su interacción con Bad, caspasa 9, factores de transcripción pertenecientes a la familia Forkhead y reguladores de NFκB.

Por otra parte, VEGF induce la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y A1 ⁽¹⁹⁹⁾, e incrementa la expresión de survivina y XIAP (*x-chromosome linked Inhibitor of Apoptosis*), cuya acción es inhibir la activación de diferentes caspasas ⁽²⁰⁰⁾.

En células endoteliales, así como en otros tipos celulares dependientes de adhesión, la cinasa de adhesión focal (FAK) es una cinasa localizada en los contactos focales que se establecen entre la membrana plasmática y el sustrato, y que es importante en promover señales de supervivencia. Se ha demostrado que VEGF causa la fosforilación de FAK así como su asociación y la de paxilina, que es una proteína asociada a FAK, a las adhesiones focales en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) ⁽²⁰¹⁾.

En vasos en formación, se ha demostrado que la integrina $\alpha V\beta 3$ es un importante factor de supervivencia ⁽²⁰²⁾. El receptor VEGFR2 se asocia a $\alpha V\beta 3$ en vasos nacientes, y la unión de esta integrina a su ligando, vitronectina, potencia la mitogenicidad y actividad de VEGFR2, así que su asociación también podría estar implicada en la promoción de supervivencia en células endoteliales.

1.5.1.1.2. Proliferación

Este factor de crecimiento es un mitógeno altamente selectivo para células endoteliales, ya sean procedentes de vasos arteriales, venosos, linfáticos y de diferente calibre ^(174, 203).

Induce la neoangiogénesis estimulando la proliferación, permeabilidad y migración capilares ⁽²⁰⁴⁾.

El descubrimiento de que VEGF es difusible y específico para las células endoteliales llevó a la hipótesis que esta sustancia jugase un papel fundamental en la regulación del crecimiento capilar, tanto en situaciones fisiológicas como en procesos patológicos ^(166, 169).

VEGF causa una potente activación de ERK 1/2 (*extracellular signalregulated kinases 1/2*) ⁽²⁰¹⁾ y de JNK (*c-Jun N-terminal protein kinase*), y probablemente la respuesta mitogénica a VEGF implique la interacción de estas dos vías de señalización ⁽²⁰⁵⁾.

Otros estudios han demostrado que la activación de las isoformas α y ζ de la proteína cinasa C (PKC), así como la inhibición de la actividad de la isoforma δ dependiente de la síntesis de óxido nítrico (NO), tienen un papel crucial en la señalización pro-mitogénica de VEGF ⁽²⁰⁶⁾.

También se ha demostrado que VEGF induce la vía *Raf*-MEK-ERK de manera independiente a *Ras* y dependiente de PKC ⁽²⁰⁷⁾, lo que sugiere que VEGF debe ser único entre los factores con receptores tirosín cinasa activando la vía ERK.

1.5.1.1.3. Migración

VEGF es un potente agente quimiotáctico para células endoteliales.

Uno de los mecanismos responsables de los efectos migratorios de VEGF en células endoteliales es a través de la activación de la vía PI3K/Akt. La activación de esta vía por VEGF induce la reorganización de los filamentos de actina dando lugar a fibras de estrés y lamelipodios, que son estructuras necesarias para el

proceso de migración. Asimismo, la activación de PI3K/Akt activa la producción de NO mediante fosforilación de eNOS⁽²⁰⁸⁾.

El NO regula la fosforilación de FAK y la integridad de las adhesiones focales en células endoteliales⁽²⁰⁸⁾, por lo que la producción de NO estaría implicada en la migración celular inducida por VEGF.

La FAK es importante regulando el recambio de las adhesiones focales, la organización de los filamentos de actina y la migración celular, y su activación es importante en la migración inducida por VEGF. VEGF induce la fosforilación de FAK y paxilina y promueve la atracción de FAK a nuevas adhesiones focales⁽²⁰¹⁾. En la activación de FAK por VEGF estaría implicada la chaperona Hsp90⁽²⁰⁹⁾.

Otros mecanismos por los que VEGF promueve migración en células endoteliales es a través de la activación de p38 MAP cinasa y de la activación de la fosfolipasa C gamma (PLC γ)⁽²⁰⁹⁾.

1.5.1.1.4. Producción de óxido nítrico (NO)

VEGF estimula la síntesis endotelial de NO. Este mediador ha sido implicado en casi todos los efectos biológicos de VEGF como son la angiogénesis, la inducción de permeabilidad o la inducción de vasodilatación.

VEGF induce la síntesis de NO a corto y largo término a través de la activación de diferentes mecanismos.

A corto término, y de manera independiente del calcio, VEGF estimula la síntesis de NO mediante la activación de la vía PI3k-Akt. Una vez activada, Akt causa la activación de eNOS a través de la fosforilación en el residuo serina 1179 de este enzima⁽²¹⁰⁾. VEGF también activa eNOS a través de la activación de la PLC γ , que causa la formación de inositol 1,4,5-trifosfato, que a su vez provoca movilización del calcio intracelular y estimulación de la eNOS a través de su unión a calmodulina⁽²¹¹⁾. Otro mecanismo de activación de la eNOS por VEGF es a través de la proteína Hsp90⁽²¹²⁾.

A largo término, VEGF induce la síntesis de eNOS a nivel de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y de proteína⁽²¹³⁾.

1.5.1.1.5. Regulación génica. Expresión de proteínas y otros factores

VEGF regula la expresión de diferentes genes en células endoteliales.

Se ha demostrado que este factor activa varios factores de transcripción, como Ets-1, Egr-1, factor nuclear de células T activadas (NFAT), y Stat 3 y 5 (*Signal transducers and activators of transcription*)⁽²¹⁴⁾.

Entre los genes diana, VEGF induce la expresión de los activadores del plasminógeno de tipo tisular y uroquinasa^(215, 216), del inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1⁽²¹⁵⁾, y de metaloproteasas degradadoras de matriz extracelular. Además, aumenta la expresión de la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1)⁽²¹⁷⁾.

1.5.1.2. Angiogénesis

1.5.1.2.1. Vasculogénesis y angiogénesis fisiológica

Este factor de crecimiento es esencial para la formación vascular del embrión así como el desarrollo vascular postnatal.

Estudios en ratones han demostrado que la carencia de un único alelo del gen de VEGF provoca graves alteraciones en el desarrollo vascular del embrión, causando su inviabilidad entre los días 11 y 12 del desarrollo^(218, 219).

Debido a este motivo, se han utilizado estrategias como la inhibición selectiva del gen de VEGF mediante el sistema *Cre-loxP*, o la administración del inhibidor selectivo de VEGF mFlt(1-3)-IgG, para estudiar las funciones de VEGF en el desarrollo postnatal. La inhibición de la expresión del gen de VEGF por el sistema *CreloxP* incrementa la tasa de mortalidad, con crecimiento corporal atrofiado y alteraciones del desarrollo de los órganos, sobre todo del hígado⁽²²⁰⁾.

Por otro lado, la inhibición de VEGF mediante la administración de mFlt(1-3)- IgG causa mortalidad y parada del crecimiento, disminución de la tasa de proliferación y alteraciones ultraestructurales de células endoteliales y otros tipos celulares, y cambios histológicos y morfológicos indicativos de fallo renal y

hepático. Las células endoteliales del hígado presentaron además un incremento del índice apoptótico ⁽²²⁰⁾.

Otro papel de VEGF en el desarrollo postnatal es la regulación de la formación y crecimiento del hueso, ya que VEGF promueve la formación de vasos que son esenciales para acoplar la desaparición del cartílago a la formación del hueso maduro.

Se ha comprobado que la inhibición de VEGF causa menos alteraciones a medida que el desarrollo del animal avanza, y se pierde la dependencia de VEGF en algún momento en la cuarta semana de desarrollo ⁽²²⁰⁾.

En el animal adulto, la angiogénesis inducida por VEGF es esencial para el desarrollo del cuerpo lúteo y su función endocrina ⁽²²¹⁾. También es importante en la angiogénesis que tiene lugar en la cicatrización de las heridas ⁽²²²⁾.

1.5.1.2.2. Angiogénesis patológica

Uno de los campos donde la acción de VEGF ha sido más estudiada ha sido en la angiogénesis tumoral.

La expresión de VEGF es necesaria para la formación de nuevos vasos sanguíneos, necesarios a su vez para que el tumor siga creciendo una vez ha alcanzado un tamaño crítico (2-3 mm³). Por ejemplo, la administración *in vivo* de anticuerpos anti VEGF, así como de inhibidores del receptor VEGFR2 o la sobre-expresión del receptor sFlt-1, provocó una marcada inhibición del crecimiento en ratones atímicos a los que se les había implantado diferentes tipos de tumores ^(101, 194, 223, 224).

Además, la implantación de células pluripotenciales embrionarias carentes del gen de VEGF en ratones atímicos no causó la formación de tumores, mientras que las células no mutadas dan lugar a teratocarcinomas muy vascularizados ⁽²¹⁹⁾.

VEGF es expresado por numerosas líneas celulares tumorales *in vitro* así como por la mayoría de tumores sólidos *in vivo* ^(197, 225). En los tumores, la expresión de VEGF está localizada sobre todo en las células tumorales, pero también es expresado por células estromales y las células endoteliales de los

nuevos vasos en formación. La expresión de VEGF es especialmente elevada en zonas hipóxicas adyacentes a las áreas necróticas.

Existen otras patologías en las que existe relación entre la expresión de VEGF y la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por ejemplo, VEGF tiene un papel en la neovascularización intraocular que tiene lugar en la diabetes mellitus, tras la oclusión de la vena central del ojo, en los recién nacidos prematuros tras una hiperoxigenación en la incubadora, o en la degeneración macular ^(197, 226); así como en otras patologías como la artritis reumatoide ⁽¹⁸⁷⁾, la psoriasis o la endometriosis ⁽²²⁷⁾.

1.5.1.3. Permeabilidad vascular

VEGF fue identificado en primer lugar como un factor secretado por células de hepatocarcinoma que era capaz de inducir permeabilidad vascular en la piel de cobayas por el ensayo de Miles ⁽¹⁶⁵⁾.

Estudios posteriores han confirmado la capacidad de VEGF de inducir permeabilidad vascular utilizando este mismo ensayo. El ensayo de Miles permite evaluar la potencia permeabilizante de una determinada sustancia aplicada de manera tópica en función de la cantidad de colorante (previamente inyectado vía intravenosa) que pasa a la zona tratada de la piel. Sin embargo, este ensayo solamente detecta la cantidad de colorante extravasado, y no evalúa el posible efecto de las sustancias probadas en la hemodinámica local, o la activación de células inflamatorias, que podrían liberar otros factores permeabilizantes.

Tratando de evitar estos problemas, otros grupos han utilizado la técnica de microoclusión de Landis ⁽²²⁸⁾ para demostrar el efecto directo de VEGF en la conductividad hidráulica y en la permeabilidad a la albúmina en monocapas de células endoteliales *in vitro* y en microvasos aislados de la circulación mesentérica de rana y rata *in situ* ^(228, 229). Utilizando esta técnica, se ha demostrado que VEGF provoca una respuesta bifásica en la conductividad hidráulica, causando un incremento agudo de unos pocos minutos de duración seguido de un aumento crónico que dura 24 horas ⁽²²⁹⁾.

A nivel ultraestructural, existen cuatro vías mayoritarias por las que tiene lugar la extravasación de fluido y solutos a través del endotelio:

- orgánulos vesículo-vacuolares,
- fenestraciones,
- poros transendoteliales
- espacios o grietas interendoteliales ⁽²³⁰⁾.

Los orgánulos vesículo-vacuolares son una serie de pequeñas vesículas (50-100 nm) conectadas entre ellas mediante fenestraciones que forman una cadena continua que va desde el polo luminal de la células al polo basal.

Las fenestraciones son discontinuidades circulares de unos 60 nanómetros (nm) de diámetro, que suelen aparecer en agrupaciones en los extremos de las células endoteliales.

Los poros transendoteliales son aberturas celulares que, al abrirse, comunican el espacio apical con el basal.

Los espacios o grietas interendoteliales aparecen como roturas parciales de las uniones de tipo estrecho (*tight*) que existen entre células endoteliales adyacentes.

Se ha demostrado que la exposición a VEGF induce la formación de orgánulos vesículo-vacuolares *in vivo* ^(231, 232), de fenestraciones *in vitro* e *in vivo* ^(232, 233), y de poros transendoteliales *in vivo* ⁽²³²⁾. De estas estructuras, la más estudiada ha sido la formación de fenestraciones.

En adultos, se ha demostrado correlación entre los tejidos con alta expresión de VEGF y la presencia de endotelio fenestrado en los mismos ⁽²³⁴⁾. Asimismo, la inyección de VEGF *in vivo* es capaz de inducir la aparición de fenestraciones en capilares de tipo continuo ⁽²³³⁾ y la neovascularización que aparece en diferentes tipos de tumores que expresan altos niveles de VEGF tiene un gran número de fenestraciones ⁽²³⁵⁾.

Por otro lado, experimentos *in vitro* con células endoteliales han revelado que la formación de fenestraciones en respuesta a VEGF requiere una matriz extracelular de idéntica composición a la membrana basal ⁽²³⁶⁾. En este mismo estudio, la formación de fenestraciones aparece asociada a caveolas.

La formación de orgánulos vesículo-vacuolares parece un efecto específico de la exposición a VEGF, ya que no se observan la formación de estas estructuras en el incremento de permeabilidad tras la exposición a histamina o al ionoforo de calcio A23187 ⁽²³²⁾.

En cuanto a los espacios interendoteliales, no se ha observado la aparición de estas ultraestructuras en respuesta a VEGF, aunque se ha demostrado que VEGF causa la fosforilación en células endoteliales de las proteínas VE-cadherina ⁽²³⁶⁾ y β -catenina ⁽²³⁷⁾ de las uniones *adherens*, y de ocludina y zona ocluden 1 ⁽²³⁸⁾, componentes de las uniones estrechas. Estos datos sugieren que VEGF también podría regular la permeabilidad interendotelial. El efecto permeabilizante de VEGF está implicado en la formación de ascitis o edema que tiene lugar en diversas patologías, como el infarto de miocardio, el infarto cerebral, la aterosclerosis, diferentes tipos de cancer, la diabetes y la psoriasis ⁽¹⁷⁶⁾.

Los mecanismos de señalización intracelular que median el incremento de la permeabilidad en respuesta a VEGF no han sido tan estudiados como los que promueven la respuesta angiogénica.

Según la hipótesis propuesta por Dvorak et al. ⁽²³⁹⁾ el incremento en la permeabilidad vascular promovido por VEGF sería un paso más de la respuesta angiogénica, de manera que en primer lugar VEGF causaría extravasación de proteínas plasmáticas que formarían un gel extravascular de fibrina que actuaría de soporte para el crecimiento y migración de las células endoteliales. Sin embargo, cada vez hay más evidencias que apuntan a que la respuesta angiogénica y el aumento de permeabilidad vascular en respuesta a VEGF son independientes y tienen lugar a través de vías diferentes de señalización. Por ejemplo, ratones *knockout* para el gen *src* o *yes*, proteínas efectoras de la respuesta a VEGF, presentan una formación vascular normal pero no tienen inducción de permeabilidad vascular en respuesta a VEGF ⁽²⁴⁰⁾.

Estudios más recientes indican que existen diferentes mediadores moleculares que actúan como interruptores moleculares dirigiendo la respuesta a VEGF en proangiogénica o propermeabilizante.

Entre estas moléculas se encuentran PKC, p38 MAPK y la proteína GTPasa Rac ⁽²⁴¹⁾. Otras moléculas implicadas en la respuesta propermeabilidad de VEGF

son las proteínas PLC γ , Akt, ERK1/2, así como el incremento de calcio intracelular⁽²³⁰⁾ y la síntesis de NO⁽²⁴²⁾.

1.5.1.4. Vasodilatación

VEGF es un agente con propiedades vasorelajantes en secciones de vasos y con efecto hipotensor *in vivo*.

La primera evidencia obtenida de la acción vasorelajante de VEGF fue obtenida por Ku et al. en 1.993⁽²⁴³⁾ en arterias coronarias caninas.

Anteriormente, Brock et al.⁽²⁴⁴⁾ había demostrado en cultivos de células HUVEC que la incubación con VEGF causa la acumulación de inositol 1, 4, 5-trifosfato y un aumento en la concentración de Ca⁺² intracelular, siendo ambos factores inductores de la síntesis de NO por células endoteliales.

Basándose en este trabajo, se investigó posteriormente el efecto de VEGF en el tono vascular de secciones de arterias coronarias previamente contraídas con prostaglandina F2 α . En este estudio, VEGF causó vasorelajación de manera dosis-dependiente. Este efecto fue confirmado en trabajos posteriores en secciones de aorta torácica, vena cava inferior y arteria pulmonar de conejo, y en corazones porcinos *in vitro*⁽²⁴⁵⁾.

También se ha demostrado el efecto hipotensor de la infusión de VEGF *in vivo* en ratas, conejos, cerdos y en humanos^(245, 246). La administración *in vivo* de diferentes inhibidores de la sintasa del óxido nítrico en los modelos experimentales utilizados han confirmado que el descenso en la presión sanguínea causado por VEGF es dependiente de la síntesis de NO⁽²⁴⁵⁾.

Hay pocos estudios, y contradictorios, respecto a qué receptor es el responsable del efecto hipotensor de VEGF.

Malavaud et al.⁽²⁴⁷⁾ demostraron que la administración intravenosa de un agonista específico del receptor VEGFR2 no causó efectos hemodinámicos en ratas, deduciendo que la disminución de la presión arterial media causada por el VEGF se debía a otro receptor. En cambio, un estudio más reciente realizado en ratas demuestra que, aunque ambos receptores median la respuesta hipotensora del VEGF, VEGFR2 tendría un mayor protagonismo en esta respuesta⁽²⁴⁸⁾.

1.5.1.5. Otras funciones

Aparte de las células endoteliales, se ha demostrado que VEGF puede promover proliferación *in vitro* en músculo liso de útero ⁽²⁴⁹⁾, células epiteliales de pigmento retiniano ⁽²⁵⁰⁾, células de conducto pancreático y células de Schwann ⁽²⁵¹⁾.

También puede tener efectos indirectos en otros tipos celulares, como proliferación y protección de hepatocitos frente a la administración de CCl₄ ⁽²⁵²⁾, o proliferación y migración de células musculares lisas ⁽²⁵³⁾ de manera indirecta tras su unión a células endoteliales, haciendo que éstas secreten otros factores que actúan en las células diana. En el trabajo de LeCouter et al. ⁽²⁵²⁾ se demuestra que este efecto de VEGF está mediado por su unión a receptores VEGFR1.

VEGF es un agente quimiotáctico para monocitos y macrófagos ⁽²⁵⁴⁾, a través de su unión al receptor VEGFR1.

También se ha descubierto que puede promover linfangiogenesis, y actuar como un agente autocrino promoviendo supervivencia o motilidad en ciertos tipos de células tumorales ⁽²⁵⁵⁾.

Además, es un agente estimulante de la hematopoyesis postnatal y causa la movilización de células pluripotenciales hematopoyéticas, atrayéndolas hacia lugares en los que tiene lugar revascularización ⁽²⁵⁶⁾.

1.5.2. ORGANIZACIÓN DEL GEN Y PROPIEDADES DE LAS ISOFORMAS DE VEGF

La localización cromosómica del gen de VEGF humano es 6p21.3 ⁽²⁵⁷⁾. Este gen está compuesto por ocho exones y siete intrones, con una región codificante de una longitud aproximada de 14 kb. A partir de este gen se generan 5 isoformas por proceso de corte y empalme alternativo, que tienen un tamaño de 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos ^(168, 169, 204, 258, 259).

Las propiedades bioquímicas de las diferentes isoformas dependen en gran parte de su capacidad o no de unión a heparina, y esto está determinado por la presencia de los exones 6 y 7.

A la isoforma VEGF₁₂₁ le faltan estos dos exones, por lo que no puede unirse a la matriz extracelular y es una proteína totalmente difundible.

La isoforma VEGF₁₄₅ carece de un fragmento del exón 6 y de la totalidad del exón 7, y a la isoforma VEGF₁₆₅ le falta el exón 6, por lo que una vez secretadas una parte queda retenida en la matriz extracelular y otra difunde libremente.

VEGF₁₈₉ sólo carece de una parte del exón 6 y tiene una inserción de 24 aminoácidos ricos en restos básicos y VEGF₂₀₆ contiene todos los exones, por lo que estas isoformas quedan totalmente secuestradas en la matriz extracelular. No obstante, tras la acción de diferentes enzimas como la heparinasa, la uroquinasa o la plasmina se puede liberar un fragmento de 110 aminoácidos con actividad biológica.

Esto sugiere que las diferentes isoformas de VEGF podrían estar biodisponibles mediante difusión libre o tras la acción de proteasas sobre las isoformas más grandes ^(197, 225).

VEGF₁₆₅ es la isoforma predominante secretada tanto por células normales como anormales ^(258, 259).

Las transcripciones de VEGF₁₂₁ y VEGF₁₈₉ se pueden detectar en la mayoría de células que expresan el gen VEGF ^(258, 259).

Por el contrario VEGF₂₀₆ es una isoforma de presentación poco habitual ⁽²⁵⁹⁾.

La proteína nativa de VEGF (VEGF₁₆₅) es una glucoproteína de 45 kDa, básica, homodimérica con varios puentes disulfuro intra e intercatenarios. Los dos monómeros se asocian de forma antiparalela, y su reducción implica la pérdida total de su actividad biológica ⁽²⁰⁴⁾.

La isoforma VEGF₁₂₁ es un péptido con propiedades de ácido débil que no liga heparina, mientras que las isoformas VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ son las más básicas y se fijan a la heparina con mayor afinidad que VEGF₁₆₅ ⁽²⁶⁰⁾.

Las isoformas VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅, son las más frecuentemente expresadas por la mayoría de tipos celulares, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas ^(170, 197).

VEGF₁₈₉ también es detectado en muchos tipos celulares. Por el contrario, VEGF₁₄₅ parece ser expresada únicamente en células derivadas de órganos reproductores, y VEGF₂₀₆ en mastocitos ⁽¹⁹⁷⁾.

VEGF₁₂₁ es una proteína soluble; no obstante existe un porcentaje significativo de VEGF₁₆₅ que, una vez segregada, queda unido a la superficie celular y a la matriz extracelular ⁽²⁶¹⁾.

VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ quedan secuestradas casi por completo en la matriz extracelular pero pueden ser liberadas a una forma soluble mediante heparina o heparinasa ⁽²⁶¹⁾. Estas formas largas también pueden ser liberadas por la plasmina tras realizar una división a nivel del extremo carboxiterminal ^(260, 261).

La activación del plasminógeno y la generación de plasmina han mostrado tener un papel importante en la cascada angiogénica ⁽²⁶²⁾. Estos procesos también juegan un papel importante en la progresión local y en la capacidad metastásica de las células tumorales ⁽²⁶³⁾.

Existen evidencias experimentales que apoyan la teoría que los factores de crecimiento “almacenados” en la matriz extracelular y liberados tras la degradación de la misma juegan un papel fundamental en los procesos citados ⁽²⁶³⁾. Así, la proteólisis de VEGF también parece tener lugar *in vivo* de una manera similar. La generación de VEGF bioactivo por división proteolítica parece tener especial importancia en el microambiente tumoral donde el aumento de expresión de las proteasas, incluyendo los activadores del plasminógeno, está bien documentada ⁽²⁶²⁾.

Estudios relativamente recientes, realizados por Keyt et al.⁽²⁶³⁾ a mitad de la década de los noventa, realizando una proteólisis de VEGF mediante plasmina mostraron que ésta escindía VEGF₁₆₅ en un fragmento de 110 aminoácidos sin afinidad por la heparina (VEGF₁₁₀) y en un fragmento de 55 aminoácidos (constituido por el extremo carboxiterminal) con capacidad para unirse a la heparina. Los mismo autores demostraron que el producto con actividad biológica de la acción de la plasmina se compone de los primeros 110 aminoácidos del extremo NH₂ terminal de VEGF, careciendo el polipéptido del extremo carboxiterminal de afinidad por los receptores de VEGF. No obstante, la pérdida de la capacidad fijadora de heparina (que reside en el extremo carboxiterminal, aminoácidos 111-165) conllevaba una pérdida notable de la capacidad de inducir mitosis de las células endoteliales. La potencia mitogénica VEGF₁₁₀ era cien veces menor que la que posee VEGF₁₆₅.

1.5.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VEGF

Son varios los mecanismos que han mostrado estar implicados en la regulación de la expresión del gen de VEGF, entre otros: la hipoxia, factores de crecimiento, mutaciones de p53, estrógenos, hormona tiroestimulante (TSH) y el óxido nítrico ⁽²⁶⁴⁾. Entre todos ellos la presión parcial de oxígeno (pO_2) juega un papel fundamental ⁽¹⁷⁴⁾.

Se ha apreciado un aumento en la expresión de VEGF-ARNm cuando se someten diversos tipos de cultivos celulares a pO_2 bajas.

En los glioblastomas multiformes y en otros tumores con componente necrótico importante, VEGF-ARNm está expresado en células tumorales que están yuxtapuestas a áreas de necrosis, sugiriendo que la hipoxia es uno de los inductores principales de la expresión génica de VEGF en el contexto de un microambiente tumoral.

Bajo condiciones hipóxicas los factores de transcripción inducibles por hipoxia-1 α (HIF1 α) y HIF2 α son estabilizados y traslocados al núcleo donde en colaboración con otro factor relacionado denominado HIF β activan el gen de VEGF a través de un elemento específico denominado elemento de respuesta a la hipoxia (HRE) ⁽²⁶⁴⁾.

La expresión de VEGF-ARNm puede ser inducida, en cultivos de queratinocitos, por varias citosinas como EGF, TGF- β y KGF.

El tratamiento de cultivos latentes de líneas celulares epiteliales y fibroblásticas con TGF- β provocó una inducción de la expresión de VEGF-ARNm así como la liberación de la propia glucoproteína en el medio de cultivo, sugiriendo que VEGF pueda comportarse como un mediador paracrino para agentes angiogénicos de acción indirecta como el TGF- β .

La interleuquina 1 β induce la expresión de VEGF en las células musculares lisas aórticas de la rata. Tanto la interleuquina 1 α como la prostaglandina E₂ (PGE₂) han mostrado tener la capacidad de inducir la expresión de VEGF en cultivos de fibroblastos sinoviales, postulándose así la participación de estas sustancias en la angiogénesis de los procesos inflamatorios.

Del mismo modo se ha probado que algunas mutaciones son capaces de inducir la expresión génica de VEGF. Así, una forma mutada del gen supresor p53 murino induce la expresión de VEGF-ARNm. También se ha identificado tanto la mutación como amplificación del gen *ras* estimula la expresión de VEGF. Este efecto se veía anulado cuando se utilizaban inhibidores de *ras* como la farnesiltransferasa. Del mismo modo, la sobreexpresión de *v-raf* y *v-Src* lleva a una estimulación de la expresión de VEGF.

En resumen, diversas alteraciones en los mecanismos de regulación celulares, no relacionadas entre sí, conllevan a una estimulación de la expresión de VEGF, sugiriendo que éste sea una vía final común para una proliferación incontrolada *in vivo* ⁽²⁶⁴⁾.

1.5.3.1. Hipoxia

La hipoxia es el principal regulador de la expresión de VEGF tanto *in vitro* como *in vivo* ⁽¹⁹⁷⁾.

El significado fisiológico de la inducción de la expresión de VEGF en respuesta a hipoxia sería el mejorar el aporte de oxígeno a zonas en las que la perfusión tisular ha sido interrumpida por algún motivo.

Dentro de la célula, la regulación de VEGF por hipoxia tiene lugar a diferentes niveles. En primer lugar, la disminución de la tensión de oxígeno causa un aumento de la transcripción del gen de VEGF a través del factor de transcripción HIF1, que es explicado en detalle en el siguiente punto. En situación de hipoxia, HIF1 es estabilizado y se une a un elemento de respuesta a hipoxia situado a 1 kb hacia arriba del sitio de inicio de transcripción. Una vez sintetizado el ARNm de VEGF, este se une a la proteína HuR y otras proteínas que inhiben la degradación del transcrito en condiciones de hipoxia ⁽²⁶⁵⁾. Además, el transporte de VEGF del retículo endoplasmático al complejo de Golgi está controlado por la chaperona ORP150, que es inducible por hipoxia ⁽²⁶⁶⁾.

1.5.3.2. Factor inducible por hipoxia-1 (HIF1)

HIF-1 es el principal responsable de la respuesta celular, local y sistémica a la hipoxia.

Fue descubierto en el año 1.992 por Semenza y Wang ⁽²⁶⁷⁾ como un factor nuclear que se unía al promotor del gen de la eritropoyetina únicamente en condiciones de hipoxia.

HIF1 es un heterodímero compuesto por una subunidad de 120 kDa, HIF-1 α , y otra subunidad de 91-94 kDa llamada HIF-1 β o ARNT (*aryl hydrocarbon nuclear translocator*). Las dos subunidades pertenecen a la familia de proteínas con capacidad de unión a ADN denominadas *basic helix-loop-helix* PAS (bHLHPAS).

HIF1 β se expresa de manera ubicua en las células de mamíferos y no está regulado por hipoxia. Además, puede dimerizar con otros miembros de la familia de proteínas bHLHPAS, como AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) y formar parte de otros complejos proteicos.

Por el contrario, la expresión de HIF1 α está finamente regulada por la concentración de oxígeno. Habitualmente en condiciones de normoxia HIF1 α es indetectable, a pesar de que hay expresión constitutiva tanto del gen como de la proteína. Esto es debido a que en condiciones normales de O₂ HIF1 α es hidroxilado en dos residuos de prolina (Pro402 y Pro564) por una HIF-prolil hidroxilasa dependiente de oxígeno. Esta modificación hace que sea reconocido por la proteína *Von Hippel-Lindau* (pVHL), que forma parte de un complejo ubiquitina-ligasa, y que causa la ubiquitinación de HIF1 α y su degradación por el proteasoma ⁽²⁶⁸⁾.

Cuando disminuye la tensión de oxígeno, HIF1 α no es hidroxilado y, por tanto, ya no es degradado por el proteasoma. En esta situación HIF1 α es activado mediante fosforilación por ERK1/2, es translocado al núcleo donde dimeriza con HIF1 β y se une a la secuencia consenso de unión a HIF A/(G)CGTG (HBS, *HIF-1 binding site*), que se encuentra en los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) presentes en los promotores de los genes diana de este factor de transcripción.

Finalmente, para poder activar la transcripción, la secuencia consenso no debe estar metilada, HIF1 debe unirse a coactivadores (por ejemplo CBP/p300,

SRC-1 o TIF-1) y a otros factores de transcripción, como AP1, HNF4 o ATF1/CREB1 para formar un complejo transcripcional totalmente funcional ⁽²⁶⁹⁾.

Además de HIF1 α , se han identificado otras dos proteínas de la familia, HIF2 α o EPAS e HIF3 α ⁽²⁷⁰⁾, que también son reguladas por la tensión de oxígeno. La expresión de estas dos subunidades está más restringida y tienen similitudes estructurales y funcionales con HIF1 α así que es posible que tengan funciones redundantes.

Por otro lado, también se han encontrado antagonistas naturales de HIF1 α : IPAS, una variante de HIF3 α ; aHIF, un ARN antisentido complementario a la región 3' no traducida de HIF1 α ; HIF1 α :Z, una isoforma carente del exón 12 inducible por zinc; y una isoforma de HIF1 α carente de los exones 11 y 12 que actúa como dominante negativo ⁽²⁷¹⁾. El hallazgo de estos antagonistas es reciente por lo que aún se desconoce su relevancia fisiológica.

1.5.3.3. Hormonas y citoquinas

Existen numerosos trabajos que describen la inducción de VEGF, tanto a nivel de ARNm como de proteína, por efecto de diferentes factores de crecimiento, citoquinas, hormonas y otros agentes en diferentes tipos celulares ⁽²⁷¹⁻²⁷³⁾.

- Entre los factores de crecimiento: EGF, TGF- β , KGF, IGF1, FGF2, HGF.
- Citoquinas: TNF- α , IL1 β , IL6, IL1 α , IL13, GMCSF, IL5, IL12, MCP1.
- Hormonas: TSH, ACTH, Insulina, hormonas esteroideas, Angiotensina II.
- Otros: PGE₁, PGE₂, gestación, acidosis, adenosina, lactato, histamina, relaxina, trombina.

1.5.3.4. Diferenciación y transformación celular

Se han detectado incremento de la expresión de VEGF en situaciones de diferenciación y transformación celular. Por ejemplo, se ha detectado un incremento en la expresión de VEGF-ARNm durante la conversión de células 3T3 del estado de preadipocito al de adipocito, y durante la diferenciación miogénica de células C2C12 ⁽²⁷²⁾.

En cuanto a la transformación, se ha demostrado que mutaciones o la amplificación de *ras* causan un incremento en la síntesis de VEGF. También se ha detectado un aumento en la expresión génica de VEGF por mutaciones inactivadoras del gen supresor de tumores von Hippel-Lindau ⁽²⁷³⁾.

1.5.4. RECEPTORES DE VEGF

Hasta el momento se han identificado 4 receptores diferentes a los que se pueden unir los miembros de la familia de VEGF (Figura 4).

Tres de ellos, receptor 1 de VEGF (VEGFR1 o Flt-1), VEGFR2 (también Flk-1 y KDR) y VEGFR3 (o Flt-4) son receptores del tipo tirosín cinasa ⁽¹⁷¹⁾.

El cuarto, neuropilina-1 (NP1), es una proteína transmembrana sin actividad tirosín cinasa.

Además, algunos miembros de la familia VEGF pueden unirse a los heparinsulfatos de la matriz extracelular.

Flt-1 (fms-like tyrosine kinase 1) y KDR (kinase-insert domain containing receptor) se unen a VEGF con gran afinidad.

Flk-1 (fetal liver kinase 1), el homólogo murino de KDR, comparte un 85% de su secuencia con el KDR humano.

Flt-4 o VEGFR-3 se expresa en vasos linfáticos ⁽²⁷⁴⁾. VEGF-A no se une a este receptor, siendo sus agonistas VEGF-C y VEGF-D ^(264, 275).

1.5.4.1. Receptores tirosín cinasa VEGFR1 y VEGFR2

En 1.990 se descubrió la existencia de receptores específicos para VEGF mediante experimentos de fijación y entrecruzamiento. Posteriormente fueron identificados los genes VEGFR1 (o Flt-1) y VEGFR2 (también Flk-1 y KDR), que codifican receptores específicos para VEGF ^(276, 277). Los dos receptores comparten un 44% de homología en su secuencia aminoacídica y conjuntamente con el receptor VEGFR3 están relacionados estructuralmente con la familia de receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

Los receptores VEGFR1 y VEGFR2 son proteínas de membrana con siete dominios de similitud a inmunoglobulina (Ig) en su parte extracelular, una única región transmembrana hidrofóbica y una secuencia consenso tirosín cinasa en su parte citoplasmática, que a su vez presenta la inserción de un dominio sin actividad catalítica ⁽²⁷⁸⁾.

Estudios de mutagénesis puntual, delección de dominios Ig y de receptores quimera han revelado que el segundo dominio con similitud a inmunoglobulina de ambos receptores es el responsable de la unión a VEGF, mientras que el tercer dominio ayuda a mantener la estructura necesaria para la unión a VEGF ⁽²⁷⁹⁾. El cuarto dominio del receptor VEGFR1 contiene a su vez un dominio para la dimerización del receptor, y se cree que en el receptor VEGFR2 tendría la misma función, aunque no existen datos experimentales que apoyen esta idea.

Los dos receptores pueden unir todas las isoformas de VEGF-A.

El receptor VEGFR1 presenta una mayor afinidad por VEGF (Kd 16-114 pM) ⁽²⁷⁷⁾ que el receptor VEGFR2 (Kd de 0.4-1 nM) pero su actividad tirosín cinasa es menor ^(264, 276).

VEGF se une preferentemente a homodímeros de receptor. También puede unirse a monómeros de receptor, pero la afinidad es 100 veces menor.

Existen dos isoformas del receptor VEGFR1, formadas por proceso de corte y empalme alternativo de un único gen. Una de ellas da lugar al receptor VEGFR1, mientras que la segunda isoforma da lugar a una molécula soluble que carece del séptimo dominio con similitud a inmunoglobulina, el dominio transmembrana y el citoplasmático ⁽²⁸⁰⁾. Esta isoforma fue identificada en células HUVEC ⁽²⁸¹⁾, y es capaz de unirse a VEGF con gran afinidad (Kd de 10-20 pM) y de inhibir la mitogénesis inducida por VEGF.

Los receptores VEGFR1 y VEGFR2 se expresan constitutivamente y de manera característica en el endotelio vascular, aunque hay otros tipos celulares que pueden expresarlos. Ambos receptores son expresados por diversos tipos de células tumorales y por células progenitoras hematopoyéticas. VEGFR1 se expresa también en monocitos, trofoblastos y células mesangiales, y VEGFR2 en megacariocitos y células progenitoras retinianas ⁽²⁸²⁾.

Estudios con ratones *knock out* han demostrado que tanto VEGFR1 como VEGFR2 son imprescindibles para la formación vascular del embrión ⁽²⁸³⁾.

En el organismo adulto, la unión de VEGF a uno u otro receptor da lugar a respuestas diferentes. Mientras que la mayoría de las respuestas funcionales de VEGF, en células endoteliales especialmente, son mediadas por el receptor

VEGFR2, no está claro si el receptor VEGFR1 es capaz de transmitir señales biológicamente significativas en este tipo celular.

Hay evidencias que apuntan a que la principal función del receptor VEGFR1 en el adulto es la de ser un regulador negativo de VEGFR2. Por ejemplo, la existencia de una isoforma soluble de VEGFR1 que inhibe la migración y la proliferación endoteliales inducidas por VEGF a través de VEGFR2 ⁽²⁸¹⁾, o la presencia de un motivo corto (ANGG) en la zona yuxtamembrana de VEGFR1 que puede suprimir la señalización y la migración celular inducidas por la activación del receptor VEGFR2 ⁽²⁸⁴⁾.

Sin embargo, VEGFR1 es capaz de transmitir señales en respuesta a VEGF en otros tipos celulares diferentes a células endoteliales. La respuesta biológica mejor caracterizada de este receptor es la estimulación de la migración en monocitos ⁽²⁵⁴⁾.

La mayoría de respuestas biológicas de VEGF tienen lugar tras la unión a VEGFR2. Al unirse, este receptor dimeriza y se activa mediante transfosforilación de los residuos Y951, Y996, Y1054 e Y1059, situados en el dominio citoplasmático cinasa. Tras su activación se asocia a diferentes proteínas con dominios SH2, como son Grb2, Nck, Shc y las proteínas fosfatasa SHP1 y SHP2⁽¹⁷²⁾. A través de este receptor VEGF estimula la producción de NO, el incremento de la expresión de ARNm y proteína de eNOS, movilización de Ca⁺², proliferación, migración, activación de PLC γ y ERK, de la vía PI3K/Akt y c-Src en células endoteliales.

Otros miembros de la familia de VEGF como PlGF y VEGF-B se unen y activan a Flt-1 exclusivamente. Sin embargo, no se han identificado agonistas selectivos, en el ser humano, para KDR; aunque Ogawa et al. ⁽²⁸⁵⁾ han identificado un ligando que denominaron VEGF-E_{NZ-7} (codificado en el genoma de parapoxvirus Orf NZ7) que se une y activa específicamente al receptor KDR pero no al receptor Flt-1.

1.5.4.2. Neuropilinas (NP)

Las neuropilinas 1 y 2 (NP1 y NP2) son proteínas transmembrana, sin actividad tirosín cinasa, originalmente identificadas como receptores de los miembros de la familia de polipéptidos semaforina/colapsina, que están implicados en la inhibición del crecimiento de los conos nerviosos ⁽²⁸⁶⁾.

Posteriormente fueron identificadas en células endoteliales, y en líneas celulares de cáncer de mama y de próstata, así como su capacidad de unión a la isoforma VEGF₁₆₅ (Kd 0.3 nM).

La proteína NP 1 también puede unirse a otros miembros de la familia de VEGF, como VEGF-B y PlGF-2 ^(282, 286), y NP 2 a la isoforma VEGF₁₄₅.

En la parte extracelular las NP tienen dos dominios de unión a complemento, dos dominios de homología al factor de coagulación V/VIII, y un dominio meprina (MAM) que es importante para la dimerización de las neuropilinas. Además tienen un fragmento transmembrana, y un dominio citoplasmático corto de 40 amino ácidos sin actividad tirosín cinasa (Figura 4) ⁽²⁸⁶⁾.

Al igual que los receptores VEGFR1 y VEGFR2, estudios en ratones *knock out* han demostrado que NP1 es un regulador esencial en la formación de la vascularización embrionaria.

La acción de las neuropilinas sería la de actuar como correceptores de VEGF₁₆₅, formando un complejo con los receptores tirosín cinasa de VEGF y potenciando así la actividad de estos ^(282, 286).

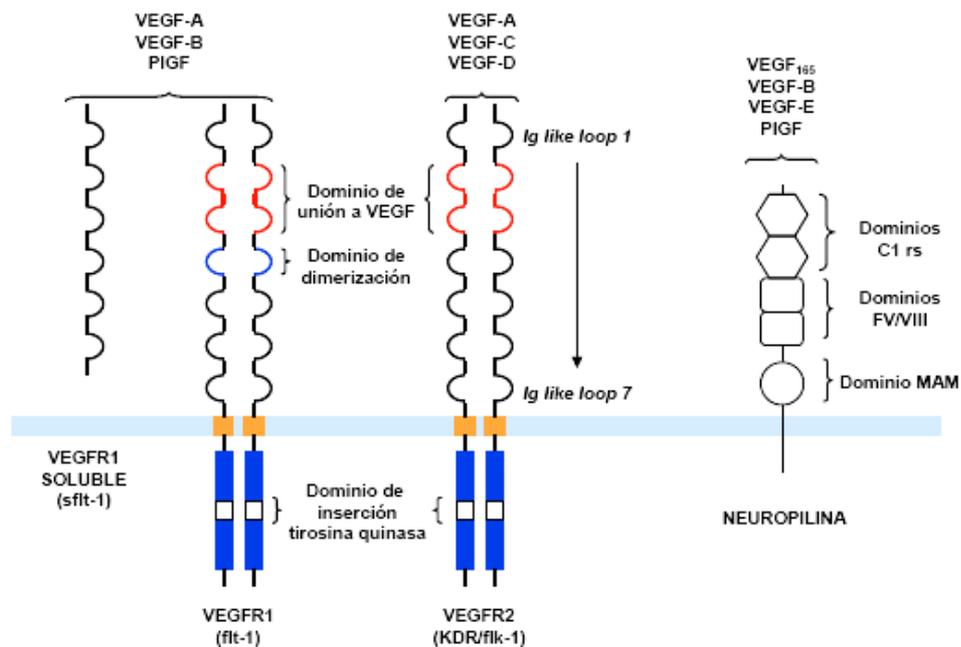


Figura 4: Características de los receptores de VEGF. Los receptores tirosín cinasa VEGFR1 (Flt1) y VEGFR2 (KDR o flk1) están formados por un dominio extracelular con 7 dominios de similitud a inmunoglobulina, un único dominio hidrofóbico transmembrana y un dominio citoplasmático con un único dominio catalítico interrumpido por la inserción de un dominio no catalítico, denominado dominio de inserción tirosín cinasa. Existe una isoforma del receptor VEGFR1 soluble, que carece de los dominios transmembrana y citoplasmático. Neuropilina es un receptor transmembrana sin actividad tirosín cinasa formado 5 dominios extracelulares, 2 de ellos con homología a los componentes del complemento C1r y C1s, 2 dominios con homología a los dominios C1 y C2 de los factores de coagulación V y VIII, y un dominio con homología MAM, además de un solo dominio transmembrana y un dominio citoplasmático corto. Adaptado de Neufeld *et al.*⁽²⁸²⁾.

1.5.5. VEGF Y CÁNCER

Como hemos visto VEGF juega un papel muy importante en la proliferación de las células endoteliales, permeabilidad vascular y en la regulación fisiológica y fisiopatológica de la angiogénesis ⁽²⁰³⁾.

Este factor de crecimiento se expresa en muchos tumores humanos ⁽²⁰³⁾, como el cáncer de próstata, neoplasias pulmonares ⁽¹⁷⁷⁾, tumores tiroideos ⁽¹⁸²⁾, cánceres de mama ⁽¹⁸⁵⁾, tumores del tracto gastrointestinal ⁽¹⁸⁶⁾, carcinomas hepatocelulares ⁽²⁸⁷⁾, neoplasias renales y vesicales ⁽¹⁷⁶⁾, tumores ováricos ⁽¹⁸³⁾, carcinomas de cérvix uterino ⁽¹⁸⁴⁾, angiosarcomas ⁽¹⁷⁸⁾ y tumores intracraneales ⁽¹⁸⁰⁾.

El ARNm de VEGF está expresado en las células tumorales pero no en las células endoteliales. Por el contrario, el ARNm de Flt-1 y KDR está expresado en las células endoteliales. Esta distribución apoya la hipótesis de que VEGF es un mediador paracrino directo de la angiogénesis tumoral, con la capacidad de promover el crecimiento tumoral y las metástasis ⁽¹²⁹⁾.

Una excepción es el angiosarcoma cuyas células expresan tanto ARNm para VEGF como para Flt-1, sugiriendo la posibilidad que en esta neoplasia VEGF sea un factor autocrino ⁽¹⁷⁸⁾.

Se han realizado varios estudios para medir los niveles séricos de VEGF como potenciales indicadores clínicos con valor pronóstico ⁽²⁸⁸⁻²⁹⁰⁾.

Se ha comprobado la presencia de niveles séricos más elevados de VEGF en pacientes con una variedad de cánceres que en la población normal y con una correlación positiva con la presencia de enfermedad metastásica ^(288, 291).

También se ha observado correlación de niveles séricos de VEGF con el estadio en pacientes con cáncer colorectal, igualmente en casos de cáncer de pulmón microcítico y estar asociado con una mala evolución ^(177, 185).

Asimismo se ha demostrado la existencia de una correlación entre la expresión de VEGF y la densidad microvascular en preparaciones histopatológicas de cáncer de mama, así como la existencia de una asociación entre la expresión de VEGF y el intervalo libre de enfermedad, siendo este menor en tumores ricos en VEGF ⁽²⁹²⁾.

Sin embargo, el análisis de otros tumores sólidos, como el melanoma maligno, sugieren que VEGF no es útil como indicador pronóstico ⁽²⁸⁹⁾.

1.6. FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLASTICO (FGF)

La familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) consta de una serie de factores de crecimiento que muestran actividad mitogénica hacia una gran variedad de células de origen mesenquimal, neuronal y epitelial. Como pueden unirse y realizar sus funciones con heparina también se han denominado factores de crecimiento ligados a heparina (HBGF) ⁽²⁹³⁾.

Se han descrito 23 factores de crecimiento de esta familia hasta la actualidad. Comprende dos miembros prototípicos, aFGF y bFGF, así como 21 factores de crecimiento más relacionados ⁽²⁹⁴⁻²⁹⁹⁾.

Estos factores de crecimiento están involucrados en muchos procesos biológicos durante el desarrollo embrionario, cicatrización, hematopoyesis y angiogénesis. Juegan un papel clave en el desarrollo de varios órganos y tejidos entre los que se incluyen extremidades, pulmón, cerebro, folículos pilosos y queratinocitos ⁽³⁰⁰⁾. Hay muy pocos órganos (tal vez ninguno) en los que la familia de FGF no esté implicada de alguna forma en su desarrollo. Por lo tanto, como reguladores de la organogénesis en general no es sorprendente que también estén implicados en el desarrollo embrionario prostático ⁽²⁹⁸⁾.

Por otro lado, la familia de FGF no sólo regula el desarrollo normal de los órganos y tejidos sino que también están implicados en el desarrollo y progresión tumoral ⁽²⁹⁹⁾.

Los factores de crecimiento pertenecientes a esta familia regulan la inducción de metaloproteinasas (MMP) en tumores renales, de vejiga y de próstata. Estas MMP degradan las proteínas de la matriz extracelular facilitando la metástasis tumoral ⁽²⁹⁹⁾.

Debido a sus potentes propiedades angiogénicas, aFGF y bFGF son los que más se han estudiado, sin embargo, hay evidencias de que otros factores de crecimiento de esta familia juegan un papel crucial en tumores renales, vesicales, testiculares y prostáticos ⁽³⁰¹⁻³⁰⁷⁾.

La alteración en la expresión de FGF puede tener unos efectos variables, incluyendo el estímulo de la proliferación o la inhibición de la muerte celular.

Esta familia de factores de crecimiento representa una de las mayores familias de polipéptidos de crecimiento y factores de diferenciación para células de origen mesodérmico y neuroectodérmico ⁽³⁰⁸⁾.

Una característica común a todos los miembros de esta familia es que su unión a heparina y heparinsulfatos, que los protegen de la degradación ^(309, 310).

Como otros factores de crecimiento sus señales están mediadas por receptores celulares tirosín cinasas. Se han aislado cuatro receptores de FGF ^(299, 311-313). Por la expresión de distintas uniones es posible para cuatro genes de receptores de FGF codificar una extensa variedad de diferentes isoformas de receptores para lograr el tipo que es necesario para la respuesta a los diferentes FGF y establecer una señal específica ^(299, 311).

Se atribuyen un gran número de funciones a la familia de FGF. Son mitogénicos para muchos tipos celulares, tanto epiteliales como mesenquimales. Estas propiedades y otras son esenciales en el desarrollo embrionario.

En el adulto, FGF está implicado en los procesos inflamatorios, cicatrización de las heridas, hematopoyesis y angiogénesis ⁽³¹⁴⁻³¹⁸⁾. Además de la estimulación de la angiogénesis, FGF ha mostrado aumentar la invasividad de una variedad de tipos de células tumorales de la próstata, vejiga, riñón, mama y páncreas confiriendo importantes propiedades para FGF durante la progresión tumoral ⁽³¹⁹⁻³²²⁾.

Varios estudios que han analizado el mecanismo de señales de FGF han revelado una compleja red de señales entre FGF, sus receptores, su proteína ligadora (FGF-BP) y glucosaminglicanos que modulan la señal de FGF ⁽³²³⁻³²⁵⁾. Hay una gran evidencia que FGF juega un papel crucial en tumores de próstata, vejiga, riñón y testículo ⁽²⁹⁷⁾.

1.6.1. FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO BÁSICO (bFGF)

1.6.1.1. Estructura del gen y funciones

La familia de FGF está compuesta por un grupo de factores de crecimiento polipeptídicos relacionados estructuralmente. Hasta la actualidad se han descrito 23 factores de crecimiento pertenecientes a esta familia y se han ido numerando consecutivamente desde FGF-1 hasta FGF-23⁽²⁹⁷⁾.

Uno de los FGF mejor caracterizados es el denominado FGF básico (bFGF o FGF-2). Fue purificado en 1.975 de la glándula pituitaria bovina por Gospodarowicz⁽³²⁶⁾. Está considerado como el factor prototípico dentro de esta familia (Figura 5)⁽³⁰⁸⁾.

El polipéptido bFGF tiene una gran afinidad por los heparinsulfatos y glucosaminglicanos, que son constituyentes muy importantes de la matriz extracelular^(323, 327). La unión de bFGF con heparinsulfatos y glucosaminglicanos de la matriz extracelular crea una reserva local de bFGF en la superficie celular y los protege de la desnaturalización y degradación proteolítica^(309, 310).

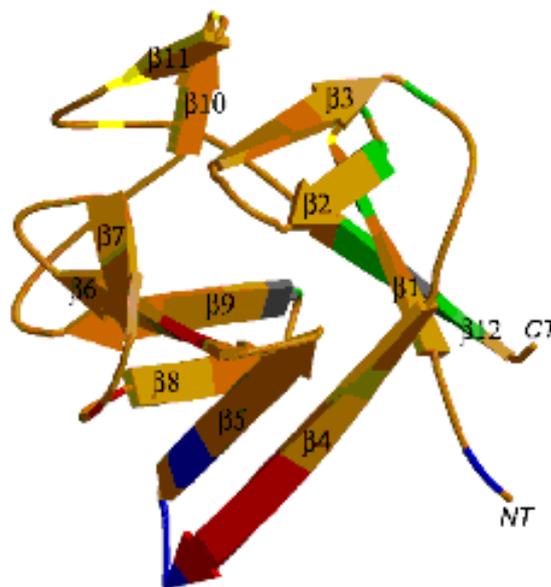


Figura 5: Estructura tridimensional de bFGF.

El genoma humano tiene sólo una copia del gen de bFGF⁽³²⁸⁾ y está localizado en el cromosoma 4q 26-27⁽³²⁹⁾, tiene un tamaño de 40 kb y codifica tres exones muy separados entre si por dos grandes intrones⁽³³⁰⁾. El primer intrón separa el codón 60 y 61; el segundo intrón separa el codón 94 y 95⁽³³¹⁾.

En la tabla 5 están representadas las localizaciones cromosómicas de los genes de los distintos FGF conocidos⁽³²³⁾.

Humanos		Ratones	
Gen	Localización	Gen	Localización
<i>FGF1</i>	5q31	<i>Fgf1</i>	18
<i>FGF2</i>	4q26-27	<i>Fgf2</i>	3A2-B
<i>FGF3</i>	11q13	<i>Fgf3</i>	7F
<i>FGF4</i>	11q13.3	<i>Fgf4</i>	7F
<i>FGF5</i>	4q21	<i>Fgf5</i>	5E1-F
<i>FGF6</i>	12p13	<i>Fgf6</i>	6F3-G1
<i>FGF7</i>	15q15-21.1	<i>Fgf7</i>	2F-G
<i>FGF8</i>	10q24	<i>Fgf8</i>	19C3-D
<i>FGF9</i>	13q11-q12	<i>Fgf9</i>	14D
<i>FGF10</i>	5p12-p13	<i>Fgf10</i>	13A3-AA
<i>FGF11</i> (<i>FHF3</i>)	17p13.1	<i>Fgf11</i>	-
<i>FGF12</i> (<i>FHF1</i>)	3q28	<i>Fgf12</i>	16B1-B3
<i>FGF13</i> (<i>FHF2</i>)	Xq26	<i>Fgf13</i>	X
<i>FGF14</i> (<i>FHF4</i>)	13q34	<i>Fgf14</i>	14
-		<i>Fgf15*</i>	7F
<i>FGF16</i>	-	<i>Fgf16</i>	-
<i>FGF17</i>	8p21	<i>Fgf17</i>	14
<i>FGF18</i>	5q34	<i>Fgf18</i>	-
<i>FGF19*</i>	11q13.1	-	
<i>FGF20</i>	8p21.3-p22	<i>Fgf20</i>	-
<i>FGF21</i>	19q13.1-qter	<i>Fgf21</i>	-
<i>FGF22</i>	19p13.3	<i>Fgf22</i>	-
<i>FGF23</i>	12p13.3	<i>Fgf23</i>	6F3-G1

Tabla 5: Localizaciones cromosómicas de FGF conocidos en humanos y ratones.

Del gen de bFGF pueden derivarse cuatro isoformas polipeptídicas diferentes con pesos moleculares de 18 kDa, 22,5 kDa, 23,1 kDa y 24,2 kDa respectivamente.

La isoforma de 18 kDa tiene un 55% de secuencia idéntica a FGF-1 (aFGF). Algunas de las formas más grandes de esta proteína se localizan en el núcleo celular^(332, 333).

También se han aislado diferentes isoformas de otros factores de crecimiento de esta familia como FGF-1 o aFGF (FGF ácido), FGF-8 o AIGF (factor de crecimiento inducido por andrógenos) y FGF-13.

Los factores bFGF, FGF-1, FGF-9 y FGF-11 al FGF-14 carecen de una señal de secuencia peptídica de secreción^(299, 332).

El factor bFGF contiene cuatro residuos de cisteína en los aa 26, 70, 88 y 93. Mientras que las cisteínas en la posición 26 y 93 se conservan las de las posiciones 70 y 88 están ausentes o localizados en otra parte en otros FGF. La mutación de estas cuatro cisteínas por serinas resulta en una proteína con la misma estructura secundaria e igual actividad mitogénica para las células 3T3 como bFGF sugiriendo que la formación de puentes disulfuro no es importante para la estructura secundaria y actividad mitogénica de bFGF.

También se ha observado que bFGF es un sustrato para la fosforilación por la proteína cinasa C (PKC) y A (PKA). PKC fosforiliza a bFGF en la serina 64, sin embargo esto no tiene ningún efecto en su actividad biológica, capacidad de unirse a la heparina y/o a su receptor. Por otro lado, PKA fosforiliza bFGF a nivel de tirosina 112 en la zona la zona de unión de bFGF al dominio del receptor, resultando una unión de 3 a 8 veces mejor. No está claro como está regulada la fosforilación de bFGF y qué papel fisiológico puede suponer para su actividad⁽²⁹⁹⁾.

Se ha observado que varios oncogenes están relacionados estructuralmente con FGF, son un grupo diverso y se han identificado en el sarcoma de Kaposi (oncogén *KS3*), en el cáncer gástrico humano (oncogén *hst*), cáncer de mama en el ratón (oncogén *int-2*) y en el tumor vesical (oncogene *FGF-5*)⁽³³¹⁾.

El oncogén *KS3* parece ser el mismo que el *hst* y las secuencias de éstos son idénticas en un 45% con la secuencia de bFGF.

El oncogén *FGF-5* tiene un 44% de secuencia idéntica a bFGF.

Estos resultados son intrigantes en vista de los hallazgos que FGF no sólo estimula la división de las células derivadas del mesodermo o neuroectodermo, sino que también son potentes agentes angiogénicos que promueven el crecimiento de nuevos vasos ⁽³³¹⁾.

Como hemos descrito anteriormente, la formación de nuevos vasos es esencial para que los tumores sólidos adquieran un tamaño significativo. La producción de FGF o proteínas relacionadas podría entonces contribuir al desarrollo de tumores sólidos por sus efectos en la división celular y angiogénesis⁽³³¹⁾.

Hay varias hipótesis para explicar la liberación de FGF de la célula: daño mecánico de la membrana plasmática con la consiguiente liberación de FGF de la célula o la formación de un complejo entre el FGF y una proteína transportadora con la posterior cosecreción ^(334, 335).

Estos factores de crecimiento median su señal a través de receptores celulares para inducir numerosos efectos biológicos ⁽³¹¹⁻³¹³⁾. Una de las funciones mejor caracterizadas es la inducción de neovascularización durante los estadios iniciales del desarrollo tumoral ^(317, 336-339).

En la tabla 6 se muestran los tipos celulares sobre los que interactúa bFGF produciendo un efecto mitógeno o afectando a su diferenciación ⁽²⁹³⁾. Como se puede observar afecta a un amplio espectro de tipos celulares mesodérmicas y neuroectodérmicas.

CÉLULAS DIPLOIDES NORMALES	
Células de la glía y astrogía	+ (D)
Oligodendrocitos	+ (D)
Células de Schwann	+
Células trabeculares	+
Células endoteliales de capilares, grandes vasos y endocardio	+ (D)
Células endoteliales corneales	+ (D)
Fibroblastos	+
Mioblastos	+ (D)
Musculatura lisa vascular	+
Condrocitos	+ (D)
Osteoblastos	+
Células del blastema	+
Células de la corteza suprarrenal	+
Células de la granulosa	+
Células epiteliales prostáticas	+
Células mesoteliales	+
Células neuronales	+
LÍNEAS CELULARES	
Rat fibroblast-I	+
Balb/c 3T3	+
Swiss 3T3	+
BHK-21	+
A-204 Rhabdomyosarcoma	+
PC-12	(D)

+ : efecto positivo en la proliferación celular. (D): induce diferenciación.

Tabla 6: Tipos celulares sobre los que interactúa bFGF.

1.6.1.2. Actividades biológicas

1.6.1.2.1. Angiogénesis y cicatrización de las heridas

El papel bien caracterizado de bFGF y aFGF como factor de crecimiento de células endoteliales y fibroblastos sugiere que una función biológica significativa de esta familia de factores de crecimiento consista en la de ser reguladores positivos de la angiogénesis ^(15, 299).

El factor bFGF induce la migración proliferación y diferenciación de células endoteliales, es decir, es un factor angiogénico. La migración y proliferación inducida por bFGF en las células endoteliales se diferencia en nuevas estructuras vasculares ^(299, 308).

Durante la angiogénesis, bFGF regula las actividades de moléculas extracelulares incluyendo colagenasas, proteinasas, activadores del plasminógeno tipo uroquinasa y las integra para la formación de nuevas estructuras cordonaes capilares que posteriormente se diferenciarán en túbulos capilares desde los cuales se formarán nuevos brotes capilares para la neovascularización ⁽²⁹⁹⁾.

En general, la formación de nuevos capilares incluye la proliferación y migración celular, así como la descomposición de los componentes circundantes de la matriz extracelular. Tanto bFGF como VEGF son dos de los factores de crecimiento más importantes en la regulación de estos procesos ^(15, 340).

La angiogénesis juega un papel biológico significativo en el proceso de cicatrización de las heridas. Se ha visto que la aplicación exógena de bFGF promueve la cicatrización cutánea de las heridas en ratas y la cicatrización del miocardio infartado tras una agresión isquémica en modelos caninos y porcinos ⁽²⁹⁹⁾.

El proceso de reparación de las heridas consta de cuatro fases: inflamación, contracción, reparación y regeneración. Hay evidencias que sugieren que bFGF puede jugar un papel importante en al menos tres de estas fases: inflamación, reparación y regeneración ⁽²⁹⁹⁾.

Estos factores de crecimiento están almacenados no sólo en la matriz extracelular, también en las células endoteliales y fibroblastos. La liberación de FGF desde estas células durante la reparación de las heridas puede ser estimulada

por la creación de la misma herida, aunque por supuesto existen otras señales desde el endotelio y el estroma aparte de las puramente mecánicas ^(299, 334).

1.6.1.2.2. Desarrollo embrionario y organogénesis

Esta familia de factores de crecimiento juega un papel importante en el desarrollo del embrión incluso antes de la implantación. Inducen división celular tanto de las células embrionarias como de las extraembrionarias en embriones de ratones desde la quinta división celular ⁽²⁹⁹⁾.

Durante el desarrollo embrionario, bFGF juega un papel importante en la organogénesis, particularmente en el sistema nervioso, pulmón y las extremidades, pero también en el desarrollo de la próstata ^(150, 341-344).

Asimismo, bFGF interviene en el crecimiento y diferenciación de varios órganos y sistemas en mamíferos y afecta a un gran número de líneas celulares incluyendo endodermo, mesodermo y neuroectodermo. Esto incluye también a las células epiteliales prostáticas, células endoteliales, células musculares lisas y osteoblastos ^(299, 342).

También estimula la hematopoyesis, la cual incluye la granulopoyesis, megacariocitopoyesis y supervivencia de las células madre ⁽³²⁸⁾.

Igualmente, bFGF interviene en la regeneración del túbulo proximal renal tras el daño inducido químicamente ⁽³⁴⁵⁾.

A nivel del desarrollo del sistema nervioso, bFGF interviene en la función de las neuronas postmitóticas derivadas del córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, retina, ganglios ciliares y médula espinal ^(328, 341).

Se ha observado que bFGF también participa en la apoptosis en los diferentes sistemas celulares ⁽³⁴⁶⁻³⁴⁸⁾.

1.6.2. RECEPTORES DE FGF (FGFR): ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Los factores de crecimiento pertenecientes a esta familia median su señal a través de cuatro receptores tirosín cinasas, denominados FGFR1 a 4, los cuales tienen una homología a nivel proteico entre el 55% y 72% ^(299, 311-313).

Los receptores consisten en un dominio extracelular (de unión o enlace), un dominio transmembrana y un dominio intracelular (cinasa). El dominio extracelular contiene a su vez, tres diferentes dominios inmunoglobulin-like (Ig I, Ig II e IgIII), el primero separado de los otros por una corta región ácida. El extremo C terminal es una de las regiones divergentes en la familia de los receptores de FGF ⁽³¹¹⁻³¹³⁾ (Figura 6).



Figura 6: Esquema de los receptores de bFGF.

Los cambios estructurales en el dominio Ig III a menudo resultan en isoformas del receptor con alteraciones importantes en la especificidad de enlaces para diferentes FGF^(299, 311).

A través de la expresión de distintas isoformas por diferentes uniones, los cuatro genes de receptores proveen un mecanismo que los capacita para conseguir unas propiedades de enlace únicas y les permite una respuesta específica para los diferentes tipos de FGF.

Al unirse a los receptores, estos polipéptidos inducen una dimerización del receptor. La formación del complejo FGF/FGFR está facilitada por heparina o glucosaminglicanos^(299, 318, 323).

Tras la activación del complejo ligando-receptor, se inician varias vías de señales: elevación de los niveles intracelulares de calcio, inducción de vías activadas por proteína-cinasa y proteína-cinasa C (PKC), estimulación de adenilato ciclasa e inducción de los protoncogenes *myc* y *fos*^(299, 349). Estas señales intracelulares resultan en varias respuestas biológicas durante la ontogénesis, crecimiento celular y procesos de reparación así como en la oncogénesis.

Los receptores FGFR están extensamente expresados en el hueso en desarrollo y varias alteraciones autosómicas dominantes del crecimiento óseo se ha mostrado que son el resultado de mutaciones en los genes de FGFR. La alteración más prevalente es la acondroplasia⁽³⁵⁰⁾. Casi todas las personas con acondroplasia muestran el cambio de glicina por arginina en el dominio transmembrana del FGFR3. Se han visto mutaciones de FGFR1, FGFR2 y FGFR3 en otros desórdenes proliferativos óseos agrupados como síndromes de craneosinostosis. A veces la misma mutación puede causar dos o más síndromes de craneosinostosis. Por ejemplo, la sustitución de una cisteína por una tirosina en FGFR2 puede causar tanto el síndrome de Pfeiffer o el de Crouzon^(351, 352).

1.6.3. SECRECIÓN Y FUNCIÓN PARACRINA DE bFGF

Hay varias hipótesis para explicar cómo es secretado bFGF desde las células para poder realizar su función paracrina.

Una hipótesis se basa en el daño o lisis de la membrana celular, esto supone la secreción pasiva desde la célula por muerte de la misma, lesión química o física, irradiación o infección. Se ha observado que la rotura de la membrana celular de pocas células sería suficiente para producir interacciones moleculares ^(334, 335).

Otra hipótesis más reciente consiste en la existencia de una proteína transportadora formando un complejo entre ella y bFGF para posteriormente secretarse conjuntamente ⁽³²⁸⁾.

Por otro lado la existencia de señales de translocación intranuclear y detección de aFGF, bFGF y FGF-11 a FGF-14 en el núcleo de células endoteliales y mesenquimales respectivamente, sugiere que estos factores de crecimiento pueden actuar internamente sin necesidad de una secuencia de señal secretora ^(297, 328).

Después de la secreción y/o liberación de las células, se encuentran rodeados de heparinsulfatos y proteoglicanos de la matriz extracelular. Estas interacciones amplían su vida media biológica porque les protege de su degradación pero anulan sus actividades biológicas ⁽²⁹⁹⁾.

Uno de los puntos menos aclarados es qué sucede desde que bFGF es secretado a la matriz extracelular hasta que activa sus receptores en la superficie de las células ⁽²⁹⁹⁾.

Se han propuesto varios mecanismos diferentes, aunque compatibles entre sí para explicar cómo bFGF es liberado de los reservorios de la matriz extracelular:

- *la unión de bFGF a la matriz extracelular limita a que sólo pueda activar los receptores de las células cercanas mediante un estricto control espacial* ⁽²⁹⁹⁾,

- *mediante movilización rápida a través de proteólisis, heparinólisis:*

enzimas, como heparinasas, que también se expresan en algunos tumores, pueden degradar las cadenas de heparinsulfatos y proteoglicanos de la matriz extracelular, liberándose entonces bFGF ⁽³⁵³⁾.

- *mediante la actividad de una proteína ligadora de FGF (FGF-BP):*

un mecanismo alternativo tiene que ver con la proteína ligadora de FGF, una proteína secretada de 17 kDa que liga de forma reversible a bFGF y aFGF evitando su degradación y conservando su actividad biológica⁽³²⁵⁾.

Aunque esta proteína es casi indetectable en tejidos normales del adulto, su expresión se encuentra muy elevada en varios tumores, incluyendo el tumor renal^(324, 325, 354-358). La sobreexpresión de FGF-BP en la línea celular del carcinoma suprarrenal humano, SW-13, tiene como resultado un fenotipo más agresivo⁽³⁵⁶⁾.

La disminución en la regulación de FGF-BP en células del cáncer de próstata humano resulta en un crecimiento disminuido *in-vitro* e *in-vivo*⁽³⁵⁵⁾.

Estas observaciones permiten plantear la hipótesis de que la regulación de la FGF-BP puede ser importante como regulación de la expresión de FGF.

Además, hay evidencia de una nueva FGF-BP, denominada FGF-BP2, que sugiere la existencia de una familia de FGF-BP^(299, 324).

Se ha propuesto que FGF-BP1 puede movilizar bFGF almacenado localmente y presentarlo a su receptor⁽³²⁴⁾.

La proteína FGF-BP1 está sobre-regulada en células escamosas, cánceres de mama y colon, y puede actuar como un “interruptor” angiogénico durante la progresión maligna de células epiteliales⁽³²⁴⁾.

Esta proteína ligadora se une directamente a bFGF y aFGF y modula positivamente las actividades biológicas de estos factores de crecimiento⁽³²⁴⁾.

Es posible que cada uno de los mecanismos descritos anteriormente actúe en momentos distintos y en diferentes situaciones:

En el primer mecanismo, bFGF puede producir señales desde la matriz extracelular y promover la quimiotaxis y la migración celular durante el desarrollo.

El segundo modelo puede explicar las acciones de bFGF durante la cicatrización de las heridas y la angiogénesis tumoral, ya que en estos procesos son activados múltiples enzimas proteolíticas y heparinasas.

Con el modelo de FGF-BP, se dispondría de un mecanismo apropiado para cuando fuera precisa una regulación fina de las señales de bFGF.

1.6.4. HIPERPLASIA BENIGNA DE PROSTATA Y FGF

Muchos elementos pertenecientes a la familia de FGF son necesarios para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento del tejido prostático.

La próstata, el prototipo de órgano andrógeno-dependiente, necesita andrógenos para el mantenimiento de su integridad funcional y estructural⁽³⁵⁹⁾. Sin embargo, células epiteliales aisladas no requieren andrógenos *in vitro*⁽³⁶⁰⁾. En cambio, su crecimiento depende de forma importante de diferentes factores de crecimiento⁽³⁶¹⁾.

Se ha planteado la hipótesis de que en la próstata los factores de crecimiento se producen localmente en respuesta al estímulo androgénico y ellos median la acción de los andrógenos⁽³⁶¹⁾. Estos factores de crecimiento son denominados de este modo andromedinas.

Varios FGF actúan como andromedinas, por ejemplo FGF-7 (también conocido como KGF), FGF-8 (factor de crecimiento inducido por andrógenos) y FGF-10 (KGF-2). Todos ellos han sido detectados en la próstata^(150, 151, 344, 362, 363).

El hecho de que FGF-7 y FGF-10 se produzcan exclusivamente en células mesenquimales pero estimulen principalmente a células epiteliales los hace candidatos ideales para ser mediadores entre las interacciones entre mesénquima-epitelio en el desarrollo de la próstata^(150, 344, 364).

Aunque la expresión de FGF-7 está regulada por las células del estroma tras la estimulación androgénica, éste no disminuye tras la castración. Análisis de los niveles séricos de FGF-7 revelan que en conjunto los niveles de FGF-7 tienden a ser inferiores en pacientes con cáncer de próstata que en pacientes con HBP⁽³⁶⁵⁾. Entonces, su papel *in vivo* no está aclarado. *In vitro* FGF-7 es capaz de inducir la activación de receptores androgénicos en líneas celulares de cáncer de próstata en ausencia de andrógenos⁽³⁶⁶⁾. Además, el estímulo de células epiteliales prostáticas con altas concentraciones de FGF-7 resultan en una sobre-regulación de ARNm de receptor androgénico⁽³⁶⁷⁾.

Estudios recientes han demostrado la inducción de FGF-7 y bFGF por interleuquinas en diferentes sistemas celulares^(161, 368, 369). En la próstata la inducción de FGF-7 y bFGF por interleuquina-1 α e interleuquina-8 se piensa que

juega un papel crítico en la patogénesis de la HBP ^(161, 369). Sin embargo el papel de esta regulación en el cáncer de próstata permanece sin dilucidarse todavía.

La acumulación de bFGF en la HBP es debida al incremento de la síntesis del factor en el tejido adenomatoso y por el aumento de la síntesis por fibroblastos prostáticos del estroma dentro de la próstata ⁽¹³¹⁾. Se almacenan en la matriz extracelular y actúa como mitógeno en el estroma ^(370, 371).

Es conocido el papel de bFGF como factor de crecimiento estimulante para el estroma prostático y las células epiteliales *in vitro* ⁽³⁷²⁾.

Por otro lado, el finasteride (un potente y específico inhibidor de la 5- α -reductasa tipo II) reduce los niveles circulantes e intraprostáticos de 5- α -dihidrotestosterona (DHT) ⁽³⁷³⁾. La reducción de la expresión de bFGF provocada por finasteride en especímenes de HBP confirma la importancia del papel de bFGF en el desarrollo de esta condición. Niveles reducidos de DHT podrían afectar negativamente a la transcripción de bFGF. Varios estudios apoyan la visión de un efecto directo de los andrógenos en la regulación del gen de bFGF a nivel de la transcripción ⁽¹³¹⁾.

Saez et al. concluyen que el finasteride podría actuar como un factor regulador negativo de la expresión de bFGF y de este modo contrarrestar el papel de bFGF en el desarrollo de la HBP ⁽³⁷¹⁾.

1.6.5. CÁNCER DE PRÓSTATA Y FGF

Los componentes de la familia de FGF pueden promover el crecimiento tumoral por diferentes mecanismos: como inductores angiogénicos, como mitógenos por sí mismos para las células tumorales y como inhibidores de la apoptosis⁽²⁹⁹⁾.

Dentro de los tumores epiteliales hay varias fuentes potenciales de FGF. En concreto, bFGF puede ser producido por las células tumorales, alrededor de las células del estroma o linfocitos que infiltran el tumor^(148, 374).

Además hay evidencia que en tumores vesicales, de próstata y renales intervienen otros elementos, como FGFR y FGF-BP, que pueden modular los efectos de FGF durante la oncogénesis⁽³⁷⁵⁻³⁷⁸⁾.

Se ha propuesto que la progresión al crecimiento maligno de la próstata está asociada con la disregulación de la expresión de varios factores de crecimiento, entre ellos los miembros de la familia de FGF⁽¹⁴⁸⁾.

Probablemente el miembro de la familia de FGF mejor estudiado en el cáncer de próstata sea bFGF⁽²⁹⁷⁾.

Aparte de sus propiedades angiogénicas la importancia de bFGF en tumores de próstata se ilustró experimentalmente en ratones (nude mice). Cuando se inyectaban de forma subcutánea, las células de líneas celulares de cáncer de próstata (LNCaP) andrógeno-sensibles, raramente formaban tumores en los ratones. Por otro lado, cuando eran inoculadas junto con una matriz de bFGF los tumores podían inducirse consistentemente^(346-348, 379).

Análisis inmunohistoquímicos de muestras de tejidos de pacientes con cáncer de próstata muestran que bFGF está principalmente expresado en las áreas tumorales, indicando una producción aumentada de bFGF por las células tumorales^(148, 363).

Como se ha descrito anteriormente, clínicamente bFGF está implicado en el crecimiento benigno y maligno de la próstata. Los niveles séricos y en orina de bFGF están aumentados en pacientes que sufren desordenes proliferativos de la próstata^(148, 380, 381).

Se ha comprobado que bFGF puede ser detectado a niveles elevados en muestras de orina de pacientes con cáncer^(340, 380). La monitorización de bFGF, y otros factores angiogénicos, en orina de pacientes con cáncer puede ser un marcador de la eficacia terapéutica en éstos⁽⁸⁵⁾.

Nguyen et al.⁽³⁸⁰⁾ detectan niveles urinarios elevados de bFGF en un 44% de pacientes con tumores de una amplia variedad de orígenes (mama, próstata, cerebro, pulmón y linfoma). Este incremento se encontraba más pronunciado en pacientes con enfermedad metastásica activa y en un grupo de pacientes disminuía tras un tratamiento con éxito de la enfermedad.

Respecto a otros miembros de la familia de FGF, el análisis de diferentes muestras clínicas revela una sobre-expresión de diferentes isoformas de FGF-8 (a, b y e) y sus receptores (FGFR1IIIc, FGFR2IIIc) en neoplasias intraepiteliales prostáticas premalignas humanas (PIN) así como en el cáncer de próstata^(382, 383). Además la expresión de FGF-8 en conjunto correlacionado con el Gleason y el estadio se asociaba con disminución de la supervivencia⁽³⁶²⁾. Todos estos datos sugieren el desempeño de un papel crucial de FGF-8 en el desarrollo del cáncer de próstata.

Recientemente Ropiquet et al.⁽³⁰³⁾ han demostrado que FGF-6, aunque indetectable en la próstata normal, está elevado en el cáncer de próstata y PIN. Además, FGF-6 es mitogénico para células epiteliales y del estroma de la próstata así como de varias líneas celulares prostáticas⁽³⁰³⁾.

Análisis de FGF-9 han demostrado que éste es el factor de crecimiento fibroblástico predominante en la próstata humana⁽³⁸⁴⁾. De todas formas, aunque FGF-9 es un potente mitógeno para las células epiteliales y del estroma prostático, su papel en el cáncer de próstata está por aclarar.

Además de por sus propiedades angiogénicas, otro mecanismo por el cual FGF influye en las metástasis del cáncer de próstata es la inducción de una metaloproteinasa, la promatrilisina. Las metaloproteinasas pertenecen a un grupo de enzimas que son responsables de la degradación de los componentes de la matriz extracelular, uno de los pasos principales en la invasión tumoral⁽³⁸⁵⁾.

Varias metaloproteinasas se expresan en el cáncer de próstata⁽³⁸⁵⁾. El factor aFGF es un potente inductor de promatrilisina en las líneas celulares del cáncer de

próstata. A elevadas concentraciones, bFGF, FGF-8 y FGF-9, también inducen la expresión de metaloproteinasas ^(386, 387).

Un importante hallazgo más es que aFGF y bFGF confieren resistencia a los fármacos anticancerosos a las células del cáncer de próstata ⁽³⁸⁸⁾. De acuerdo con esto, inhibidores de FGF como la suramina, aumentan la actividad antitumoral de quimioterápicos como la doxorubicina en células PC-3 ⁽³⁸⁹⁾.

Como la familia FGF, los receptores FGFR y las proteínas FGF-BP son componentes de una compleja red de señales tanto en tejidos urológicos normales como malignos, representan unos potenciales marcadores y/o dianas para el tratamiento de tumores urológicos ⁽¹⁴⁸⁾.

Como se ha comentado previamente se encuentran niveles elevados de aFGF y bFGF en orina y en suero de pacientes que padecen tumores malignos de vejiga, próstata y riñón ^(375-378, 380). Sin embargo, debido a su interferencia con los procesos inflamatorios, la especificidad de los niveles séricos de aFGF y bFGF como marcador tumoral es limitada. Aunque la determinación intratumoral de aFGF y bFGF por métodos inmunohistoquímicos o por hibridación in situ puede ser de ayuda para identificar qué tumores van a progresar ^(148, 322, 390).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El PSA es el mejor marcador tumoral disponible y utilizado en la actualidad para el diagnóstico y seguimiento del tratamiento del cáncer de próstata ⁽⁴⁹⁾.

La discriminación entre la patología benigna y maligna de la próstata, en especial entre la hiperplasia benigna de próstata (HBP) y el cáncer de próstata es crucial.

Desafortunadamente, el PSA no siempre puede distinguir eficientemente entre enfermedad maligna y benigna de la próstata, especialmente en el intervalo de valores entre 4,1 y 10,0 ng/ml, y cuando el tacto rectal es normal ⁽⁴⁹⁾.

La angiogénesis tumoral es un proceso de incremento de vascularización tumoral que es crítica para el crecimiento tumoral y la progresión del cáncer ^(84, 116, 391).

La angiogénesis también juega un papel predominante en la invasión de las células tumorales a la circulación y crecimiento de micrometástasis latentes a lo largo del tiempo.

La evidencia de que el crecimiento del cáncer de próstata y la progresión es angiogénesis dependiente se ha demostrado por la correlación entre la neovascularización en tejido prostático tumoral con el incremento de la densidad vascular y la expresión de los factores de crecimiento angiogénicos mediante técnicas de inmunohistoquímica ⁽³⁹²⁻³⁹⁴⁾.

Hay evidencias que apoyan la intervención de factores de crecimiento en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata ⁽⁴⁾.

La realización de pruebas moleculares cuantitativas de factores angiogénicos tienen un valor enorme en la determinación del perfil angiogénico del cáncer de próstata a través de varios estadios de su progresión ^(392, 395).

En relación con esto, se ha encontrado que VEGF y bFGF juegan un papel predominante en varios estudios sobre modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* del cáncer de próstata ⁽³⁹⁵⁾.

Atendiendo a esto nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

Los factores de crecimiento VEGF y bFGF pueden ser útiles para ayudar a la evaluación del papel de la angiogénesis en la predicción del potencial maligno y progresión del cáncer de próstata y también a su uso como un marcador independiente que complemente los parámetros diagnósticos y pronósticos utilizados comúnmente como son el estadio clínico, puntuación de Gleason y los niveles séricos de PSA.

El objetivo de esta tesis es evaluar los niveles séricos de VEGF y urinarios de bFGF en una serie de pacientes a los que se les ha indicado una biopsia prostática y relacionar estos niveles tanto en el grupo de pacientes con patología benigna como maligna de próstata, en el momento del diagnóstico y a su vez, relacionar en el grupo de pacientes con patología maligna los factores de crecimiento estudiados con una serie de parámetros diagnósticos y pronósticos utilizados habitualmente y con la mortalidad cáncer-específica en los ocho primeros años de seguimiento.

Para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Comprobar si existe relación entre los niveles séricos de VEGF con la patología benigna y maligna prostática, en el momento del diagnóstico inicial.
2. Determinar si existe relación entre los niveles séricos de VEGF y los niveles séricos de PSA, edad, estadio clínico tumoral, grado de Gleason y presencia de enfermedad diseminada (metástasis), en el momento del diagnóstico inicial, así como con la mortalidad cáncer específica en los ocho primeros años de seguimiento.
3. Comprobar si existe relación entre los niveles urinarios de bFGF con la patología benigna y maligna prostática, en el momento del diagnóstico inicial.

4. Determinar si existe relación entre los niveles urinarios de bFGF y los niveles séricos de PSA, edad, estadio clínico tumoral, grado de Gleason y presencia de enfermedad diseminada (metástasis), en el momento del diagnóstico inicial, así como con la mortalidad cáncer específica en los ocho primeros años de seguimiento.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DATOS GENERALES

Se incluyeron 71 pacientes con indicación de realización de ecografía transrectal y biopsia prostática ecodirigida procedentes del área de población del Servicio de Urología del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia entre los años 1995 y 1996.

La indicación de ecografía transrectal y biopsia prostática fue: tacto rectal sospechoso y/o un valor sérico de PSA mayor de 4,0 ng/ml.

No se incluyeron en el estudio aquellos pacientes con antecedentes de neoplasias previas, diabetes, enfermedad cardíaca activa, tratamientos anticoagulantes y los que presentaron infecciones agudas, sondaje uretral o cirugía transuretral en las cuatro semanas previas a la realización de la ecografía y biopsia prostática.

Se les sometió a una anamnesis y exploración física por aparatos prestando especial atención en la palpación abdominal y de fosas renales, exploración de genitales y tacto rectal. Se solicitó a los pacientes una analítica con bioquímica sanguínea, hemograma, hemostasia y PSA sérico.

Los pacientes fueron agrupados posteriormente según el diagnóstico en aquellos cuyo resultado fue positivo para patología maligna (Grupo A) y los que no (Grupo B).

En todos los pacientes del grupo A el diagnóstico fue de adenocarcinoma de próstata y en los del grupo B de hiperplasia benigna de próstata (HBP).

El estadiaje clínico del grupo A se realizó mediante el tacto rectal, PSA, ecografía transrectal, rastreo óseo y tomografía axial computerizada (TAC).

Se utilizó la clasificación TNM de la International Union Against Cancer de 1.992.

El grado histológico se valoró según el método de Gleason.

3.2. SEGUIMIENTO

Tras el diagnóstico y estadiaje de los pacientes con adenocarcinoma de próstata se propuso tratamiento (farmacológico, radioterápico o quirúrgico) u observación según el estadio y cada caso.

En el caso de los pacientes con HBP se instauró tratamiento farmacológico, quirúrgico o seguimiento sin ningún tratamiento específico y controles periodicos con PSA y tacto rectal.

El seguimiento máximo fue de 96 meses.

3.3. TÉCNICA DE ECOGRAFÍA Y BIOPSIA

El estudio ecográfico se realizó con un equipo B&K Medical (Diagnostic Ultrasound System 3535), utilizándose un transductor endosónico multiplano (modelo 8551) de 7 MHz.

Las agujas de biopsia eran del calibre 16 G y de 20 cm de longitud.

Se realizó extracción sanguínea para la medición de niveles séricos de VEGF y recogida de orina para la determinación de niveles urinarios de bFGF y creatinina en orina antes de la realización de la ecografía transrectal y biopsia prostática.

Todos los pacientes se prepararon con un enema de limpieza la noche previa y la mañana de la exploración y en todos los casos se administró profilaxis antibiótica. Se administró gentamicina 240 mg intramuscular (IM) (si la función renal era normal) o ceftriaxona 1 g IM.

La exploración se realizó en posición de litotomía y previamente a la introducción del transductor se realizó un tacto rectal y se impregnó el mismo con Xilocáína gel[®].

Introducimos el transductor activado y seleccionamos el modo transversal fijando la imagen donde observamos que los diámetros transversal y anteroposterior son mayores, y procedemos a su medición. Cambiamos a posición sagital y medimos la distancia cuello vesical-ápex prostático, exploramos a continuación el área trapecoidal, la vejiga, las vesículas seminales y su relación con la parte cefálica de la próstata. De nuevo en transversal, exploramos detenidamente cada

lóbulo prostático con especial interés en la zona periférica de la glándula de ápex a cuello vesical buscando alteraciones en la ecoestructura y en los límites de la glándula, situando estas anomalías en el eje de giro del transductor y pasando de la sección transversa a la sagital para completar el estudio de la ecoestructura y la situación de las posibles lesiones. Finalmente estudiamos las vesículas seminales en cortes transversales.

Durante todo el procedimiento registramos mediante una impresora térmica las imágenes más significativas.

Los cálculos de volumen prostático y PSA_d se realizaron sobre la pantalla empleando el software propio del equipo.

Se realizaron biopsias sextantes y de las lesiones ecográficas sospechosas.

3.4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE PSA

Los niveles séricos de PSA se determinaron con una técnica de inmunoanálisis (*Chemiluminescent Microparticle Immunoassay: CMIA*) de Abbott Diagnostics, cuyos valores de referencia de normalidad son entre 0,0 y 4,0 ng/ml.

3.5. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE VEGF

Previamente a la realización de la ecografía transrectal y biopsia prostática se realizó extracción de 15 ml de sangre en tubo seco. Se dejaba formar el coágulo durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaba la muestra a 3.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. Se separaba el suero y se repartía en alícuotas de 1,5 ml, congelándose a -70°C hasta su determinación.

Para la determinación cuantitativa de VEGF se utilizó una técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) en sándwich (Quantikine[®] Human VEGF Immunoassay de la firma R&D Systems Europe) según instrucciones del fabricante.

Básicamente la técnica consiste en una reacción colorimétrica mediada por una reacción antígeno-anticuerpo entre VEGF y un anticuerpo específico contra VEGF.

Los estándares, suministrados por el fabricante, y las muestras de suero a estudio se pipetea en los pocillos de la placa, que están revestidos por un anticuerpo monoclonal específico contra VEGF; así cualquier VEGF presente en el suero es inmovilizado en el pocillo. Después de lavar los pocillos para eliminar cualquier sustancia que no haya sido fijada por el anticuerpo monoclonal se añade un anticuerpo policlonal unido a un enzima. Se vuelve a lavar y se añade una solución sustrato desarrollándose color en forma proporcional a la cantidad de VEGF que haya quedado fijada en el pocillo en el primer paso. La reacción colorimétrica es detenida y la intensidad del color se mide con ayuda de un lector de densidad óptica (fotómetro) a 450 nm. La concentración de VEGF en las muestras se determina comparando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar.

El valor sérico de VEGF se expresa en picogramos por mililitro (pg/ml).

3.6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES URINARIOS DE bFGF

Se recogía de forma aséptica 20 ml de orina de la primera micción de la mañana, se centrifugaba a 850 rpm durante 20 minutos para desechar el sedimento, como se recomienda para la valoración de bFGF ^(340, 378). El sobrenadante se repartía en alícuotas de 1,5 ml las cuales se congelaban a una temperatura ≤ -20 °C hasta su procesamiento en el que se descongelaba a temperatura ambiente.

De cada muestra se remitía 1 ml al laboratorio de bioquímica del hospital para determinar la concentración de creatinina urinaria.

Para la determinación de bFGF en orina se utilizó la técnica comercial de ELISA Quantikine[®] HS FGF basic Immunoassay kit (R&D Systems) mediante la cual bFGF puede ser calculado cuantitativamente en suero, plasma y orina. Esta técnica reconoce tanto bFGF natural como el recombinante y no muestra reacciones cruzadas con aFGF, FGF4 ni KGF. Todas las medidas se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Dado que el estado de hidratación y volumen urinario de cada paciente varía, cada valor urinario de bFGF fue normalizado al valor de creatinina urinaria ^{(83, 340,}

³⁷⁸⁾ dividiendo la concentración de bFGF de cada muestra por su concentración de creatinina y expresándola en nanogramos por gramo de creatinina en orina (ng/g).

3.7. ESTUDIO ESTADÍSTICO

El proceso estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS 10.0.6 para Windows en un ordenador compatible.

Como VEGF y bFGF no siguen una distribución normal se ha utilizado la mediana y los niveles mínimo y máximo como medidas descriptivas de las variables.

Dadas las características de las variables estudiadas se utilizaron tests no paramétricos como el test de Chi cuadrado para variables cualitativas y los test de U de Mann–Whitney y de Kruskal Wallis para variables cuantitativas así como el coeficiente de correlación de Pearson.

Se han empleado las curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) como medidas de rendimiento diagnóstico de sensibilidad y especificidad.

El cálculo de la supervivencia se ha realizado mediante el método actuarial de Kaplan-Meier.

El nivel de significación estadística se consideró con un valor de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS GRUPOS

Grupo A, formado por pacientes con adenocarcinoma de próstata. Está compuesto por 23 pacientes (32,4%).

Grupo B, formado por pacientes con HBP. Está compuesto por 48 pacientes (67,6%).

Mediana de seguimiento: 69 meses (5 – 96 meses).

4.2. RESULTADOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Edad:

Mediana de edad del grupo A (n=23): 75 años (rango 60 a 84 años).

Mediana de edad del grupo B (n=48): 70 años (rango 53 a 83 años).

Edad agrupada:

Grupo A: las frecuencias de los diferentes grupos de edad vienen reflejadas en la tabla 7.

	Frecuencia	Porcentaje
51 - 60 años	2	8,7%
61 - 70 años	7	30,4%
71 - 80 años	10	43,5%
> 81 años	4	17,4%
Total	23	100,0%

Tabla 7: Grupos de edad del grupo A.

Grupo B: las frecuencias de los grupos de edad están expresadas en la tabla 8.

	Frecuencia	Porcentaje
51 - 60 años	9	18,8%
61 - 70 años	19	39,6%
71 - 80 años	19	39,6%
> 81 años	1	2,1%
Total	48	100,0%

Tabla 8: Grupos de edad del grupo B.

Motivo de consulta:

Las frecuencias de los distintos motivos de consulta para el grupo A vienen reflejadas en la tabla 9.

	Frecuencia	Porcentaje
Prostatismo	17	73,9%
PSA elevado	5	21,7%
Hematuria	0	0,0%
Infección urinaria	1	4,3%
Total	23	100,0%

Tabla 9: Motivo de consulta en el grupo A.

En la tabla 10 están expresados los distintos motivos de consulta del grupo B. En ambos el prostatismo fue el más frecuente.

	Frecuencia	Porcentaje
Prostatismo	39	81,3%
PSA elevado	5	10,4%
Hematuria	2	4,2%
Infección urinaria	2	4,2%
Total	48	100,0%

Tabla 10: Motivo de consulta en el grupo B.

Síndrome de prostatismo:

Las características del síndrome prostático en el grupo A se muestran en la tabla 11.

	Frecuencia	Porcentaje
Irritativos	5	21,7%
Obstructivos	7	30,4%
Mixtos	8	34,8%
No	3	13,0%
Total	23	100,0%

Tabla 11: Características del síndrome prostático en el grupo A.

Las características del síndrome prostático en el grupo B vienen reflejadas en la tabla 12.

	Frecuencia	Porcentaje
Irritativos	13	27,1%
Obstructivos	13	27,1%
Mixtos	19	39,6%
No	3	6,3%
Total	48	100,0%

Tabla 12: Características del síndrome prostático en el grupo B.

Tacto rectal:

La relación entre las características del tacto rectal en cada grupo de estudio se expresa en la tabla 13.

	Grupo A	Grupo B	Total
Benigno	6	35	41
Dudoso	5	8	13
Maligno	12	5	17
Total	23	48	71

$p < 0,001$

Tabla 13: Características del tacto rectal en ambos grupos.

PSA:

Las concentraciones séricas de PSA en los grupos de estudio están reflejadas en la tabla 14. Los valores de PSA están expresados en ng/ml.

	Mediana	Mínimo	Máximo
Grupo A	10,80	2,00	686,00
Grupo B	7,85	0,97	37,40

$p = 0,10$

Tabla 14: Concentraciones séricas de PSA.

PSA agrupado:

La tabla 15 muestra la distribución del PSA cualitativo en ambos grupos. Se ha utilizado el Chi cuadrado para calcular el grado de significación estadística.

Nótese que el 43,4% de pacientes del grupo A y el 54,2% del grupo B tienen valores de PSA comprendidos entre 4,1 y 10,0 ng/ml.

	Grupo A	Grupo B	Total
<=4	1	5	6
>4 - <=10	10	26	36
>10	12	17	29
Total	23	48	71

p= 0,15

Tabla 15: Valores de PSA agrupado en ambos grupos.

PSA densidad:

En la siguiente tabla está expresada la mediana y rango de los valores del PSA densidad en ambos grupos de estudio.

	Mediana	Mínimo	Máximo
Grupo A	0,26	0,11	14,20
Grupo B	0,15	0,04	1,00

p= 0,01

Tabla 16: Mediana de PSA densidad en ambos grupos.

Relación PSA libre/PSA total:

En la tabla 17 se expresan la mediana y el rango de los valores de la relación PSAL/PSA total en ambos grupos.

	N	Mediana	Mínimo	Máximo
Grupo A	15	0,13	0,05	0,23
Grupo B	30	0,14	0,01	0,39

p= 0,782

Tabla 17: Comparación de valores de PSAL/PSA total en ambos grupos.

Imagen ecográfica:

En la siguiente tabla se muestran los datos de imagen obtenidos de la ecografía transrectal realizada a los pacientes.

	Grupo A	Grupo B	Total
Lesión	7	13	20
Lesión+rotura capsular	5	1	6
Normal	11	34	45
Total	23	48	71

p= 0,014

Tabla 18: Características ecográficas de la glándula prostática en ambos grupos.

Estudio anatomopatológico:

En la tabla 19 está expresada la distribución del diagnóstico anatomopatológico de las biopsias realizadas.

	Grupo A		Grupo B	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Gleason 2-4	15	65,2%	0	0,0%
Gleason 5-7	7	30,4%	0	0,0%
Gleason 8-10	1	4,3%	0	0,0%
HBP	0	0,0%	48	100,0%
Total	23	100,0%	48	100,0%

Tabla 19: Distribución del diagnóstico anatomopatológico de las biopsias de ambos grupos de estudio.

Estadio:

La tabla 20 muestra la distribución por estadios clínicos de las neoplasias del grupo A.

	Recuento	%
T1c	8	34,8%
T2a	10	43,5%
T3a	1	4,3%
T3b	2	8,7%
T3c	2	8,7%
Total	23	100,0%

Tabla 20: Estadio clínico tumoral (T).

Metástasis:

Número y porcentaje de pacientes con metástasis al diagnóstico en el grupo A.

	Recuento	%
M0	18	78,3%
M+	5	21,7%
Total	23	100,0%

Tabla 21: Metástasis en el grupo A.

Creatinina urinaria:

En la tabla 22 se expresa la mediana y el rango de los valores de la creatinina urinaria en ambos grupos de estudio expresada en mg/dl.

	Mediana	Mínimo	Máximo
Grupo A	70,00	12,80	109,20
Grupo B	71,25	18,40	143,20
Total	71,10	12,80	143,20

p= 0,71

Tabla 22: Creatinina urinaria en ambos grupos de estudio.

Niveles séricos de VEGF:

En la tabla 23 se refleja la mediana y los valores mínimos y máximos de los niveles séricos de VEGF en ambos grupos. Los valores de VEGF están expresados en pg/ml. No se aprecian diferencias significativas entre ambos grupos ($p= 0,069$), aunque se observa una tendencia a valores más elevados en el grupo A (Figura 6).

	Mediana	Mínimo	Máximo
Grupo A	964,00	31,20	2500,00
Grupo B	499,00	3,24	2500,00

$p= 0,069$

Tabla 23: Niveles séricos de VEGF en ambos grupos.

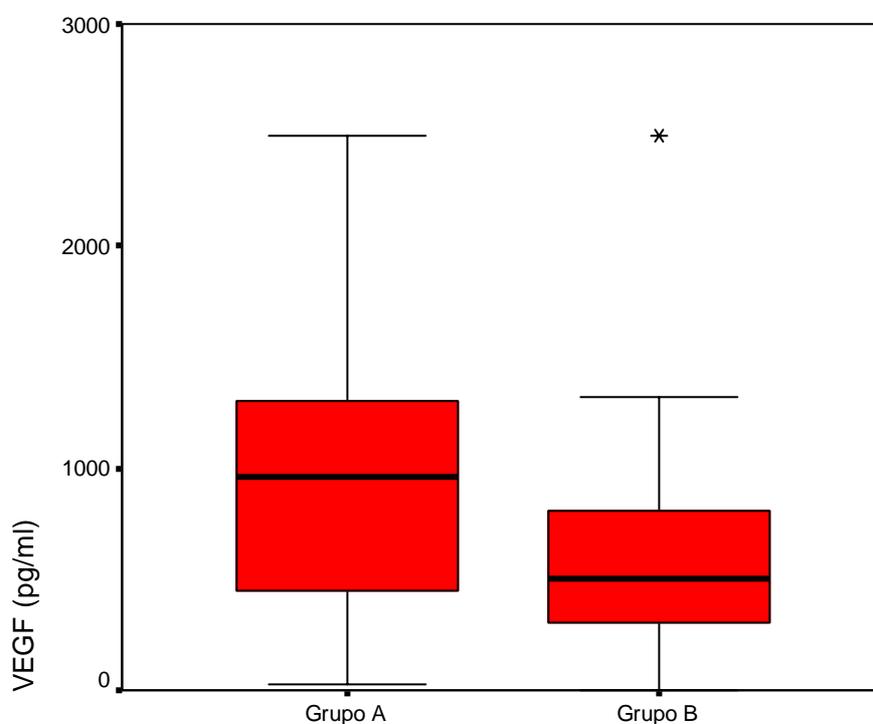


Figura 6: Diagrama de cajas de los niveles séricos de VEGF.

Niveles urinarios de bFGF:

En la tabla 24 viene reflejada la mediana y rango de los niveles urinarios de bFGF en ambos grupos de estudio. No se encuentra diferencias significativas entre ambos grupos ($p= 0,477$).

El valor de bFGF se ajustó al nivel de creatinina urinaria en cada paciente y se expresa en ng por g de creatinina en orina (ng/g).

	Mediana	Mínimo	Máximo
Grupo A	0,46	0,23	17,62
Grupo B	0,89	0,21	31,62

$p= 0,477$

Tabla 24: Valores de bFGF en orina en ambos grupos.

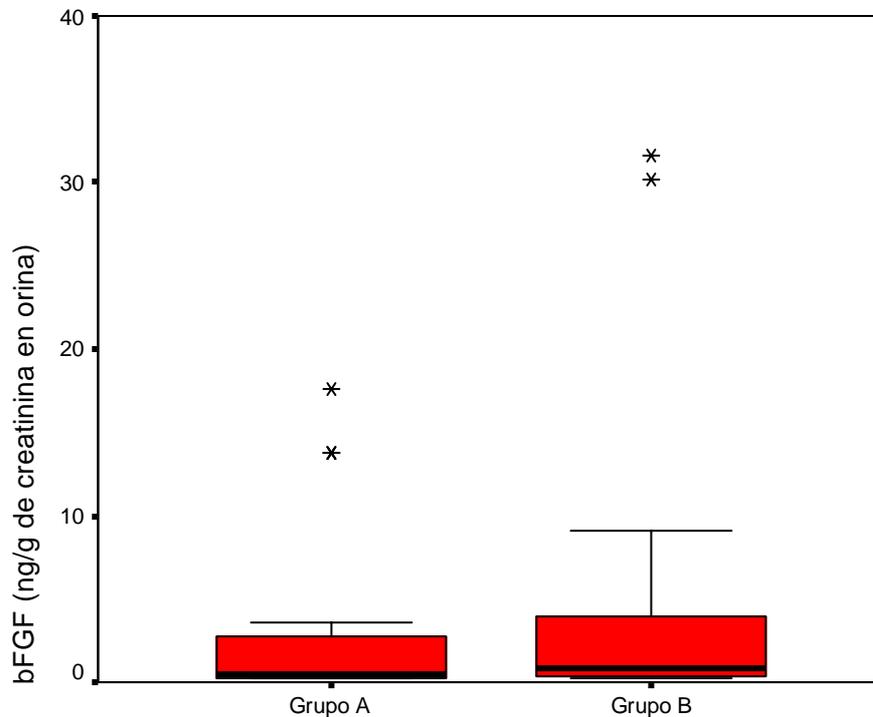


Figura 7: Diagrama de cajas de los valores de bFGF en ambos grupos de estudio.

Éxitus:

La mortalidad cáncer dependiente en el grupo A es del 17,4%, siendo la tasa de mortalidad global del 16,9%.

Valores de VEGF y bFGF:

En la tabla 25 se muestran los valores séricos obtenidos de VEGF y urinarios de bFGF. También se muestran los valores de creatinina urinaria así como los valores de bFGF ajustados a los niveles de ésta.

PACIENTE	VEGF(pg/ml)	bFGF(pg/ml)	Cr ORINA (mg/dl)	bFGF(ng/g)
1	462,04	1,87	104,90	1,78
2	599,48	0,88	91,30	0,96
3	552,90	5,31	70,70	7,51
4	253,46	1,23	48,70	2,52
5	60,54	0,25	18,40	1,36
6	448,88	4,33	63,80	6,78
7	280,62	1,78	127,80	1,39
8	319,08	0,25	68,80	0,36
9	532,58	0,25	1180	0,21
10	2000,00	4,71	71,90	6,56
11	499,00	0,25	70,90	0,35
12	47,00	0,25	73,40	0,34
13	358,00	0,25	67,60	0,37
14	501,00	0,25	65,20	0,38
15	351,36	3,36	34,60	9,70
16	300,24	0,25	42,50	0,59
17	233,54	0,25	71,30	0,35
18	438,08	0,25	61,10	0,41
19	1321,58	0,25	58,50	0,43
20	286,00	0,25	47,20	0,53
21	964,00	0,25	50,90	0,49
22	1765,64	0,25	49,40	0,51
23	331,96	7,42	60,20	12,33
24	1050,02	0,85	51,60	1,65
25	1267,40	0,39	90,30	0,43
26	1166,56	1,18	71,60	1,65
27	1360,58	2,51	72,10	3,48
28	1768,6	16,00	90,80	17,62
29	1017,18	0,43	49,90	0,87
30	190,68	0,68	73,40	0,92
31	249,74	6,77	21,40	31,62
32	515,86	5,67	75,30	7,54
33	524,00	0,25	73,10	0,34
34	649,72	3,99	120,80	3,30
35	1023,94	0,46	12,80	3,57

PACIENTE	VEGF(pg/ml)	bFGF(pg/ml)	Cr ORINA (mg/dl)	bFGF(ng/g)
36	643,89	5,38	122,10	4,40
37	800,02	2,42	60,90	3,97
38	372,52	0,25	58,10	0,43
39	733,70	2,71	58,30	4,65
40	2282,00	0,25	49,70	0,50
41	505,10	6,18	67,60	9,15
42	202,10	0,25	27,60	0,91
43	1236,64	1,99	104,30	1,92
44	1281,54	6,95	50,70	13,71
45	456,06	5,63	40,90	13,76
46	31,20	0,56	27,40	2,07
47	471,62	12,53	41,60	30,12
48	1571,28	0,59	143,20	0,41
49	1021,00	0,25	100,20	0,25
50	237,89	0,25	92,70	0,27
51	412,00	0,25	101,20	0,25
52	1321,00	0,25	97,30	0,26
53	1249,00	0,25	102,40	0,24
54	709,00	0,25	107,30	0,23
55	979,00	0,46	12,80	3,57
56	249,00	0,25	109,20	0,23
57	208,00	0,25	89,30	0,28
58	437,00	0,25	97,20	0,26
59	248,00	0,25	104,30	0,24
60	812,00	0,25	68,70	0,36
61	660,00	0,25	89,30	0,28
62	2500,00	0,25	19,20	1,30
63	1668,00	0,25	77,90	0,32
64	311,00	0,25	97,40	0,26
65	509,00	0,25	101,30	0,25
66	3,24	0,25	107,20	0,23
67	111,00	0,43	49,80	0,87
68	2500,00	0,25	89,20	0,28
69	2500,00	0,40	90,10	0,43
70	169,00	0,25	49,60	0,50
71	818,00	0,25	49,70	0,50

Tabla 25: Niveles séricos de VEGF y urinarios de bFGF (valores obtenidos y normalizados al nivel de creatinina urinaria).

4.3. RELACIONES ENTRE VARIABLES

4.3.1. Relación entre PSA y grado de Gleason, estadio, presencia de metástasis y éxitus

Se aprecia una relación significativa ($p= 0,039$) entre el PSA sérico y el grado de Gleason en el grupo A (Tabla 26), de forma que grados de Gleason más altos tienen niveles séricos de PSA superiores.

También se aprecia relación entre el PSA y éxitus tumor específico (Tabla 29).

Sin embargo, no se aprecia relación estadísticamente significativa entre el nivel sérico de PSA y el estadio clínico tumoral en el grupo A ($p= 0,72$), ni entre el PSA y la existencia o no de metástasis ($p= 0,53$) (Tablas 27 y 28).

	Mediana	Mínimo	Máximo
Gleason 2-4	8,40	2,00	38,00
Gleason 5-7	16,30	6,90	686,00
Gleason 8-10	139,00	139,00	139,00

$p= 0,039$

Tabla 26: Relación entre PSA sérico y Gleason.

T	N	Mediana	Mínimo	Máximo
T1c	8	13,93	6,90	38,00
T2a	10	7,32	2,00	25,20
T3a	1	14,70	14,70	14,70
T3b	2	274,20	8,40	540,00
T3c	2	412,50	139,00	686,00

$p= 0,72$

Tabla 27: Relación entre PSA sérico y estadio en el grupo A.

	N	Mediana	Mínimo	Máximo
M0	66	8,33	0,97	38,00
M1	5	139,00	6,90	686,00

p= 0,53

Tabla 28: Relación entre PSA sérico y metástasis.

Éxito	N	Mediana	Mínimo	Máximo
No	67	8,25	0,97	38,00
Si	4	339,50	14,70	686,00
Total	71	8,41	0,97	686,00

p= 0,003

Tabla 29: Relación entre PSA y éxito tumor específico.

4.3.2. Relación entre estadio clínico, presencia de metástasis y éxito

Se observa una relación significativa entre el estadio clínico tumoral y la presencia de metástasis (p= 0,001) así como con el éxito tumor dependiente (p= 0,001).

	M0	M1	Total
T1c	7	1	8
T2a	10	0	10
T3a	1	0	1
T3b	0	2	2
T3c	0	2	2
Total	18	5	23

p= 0,001

Tabla 30: Relación entre estadio T y presencia de metástasis.

	No	Si	Total
T1c	8	0	8
T2a	10	0	10
T3a	0	1	1
T3b	1	1	2
T3c	0	2	2
Total	19	4	23

p= 0,001

Tabla 31: Relación entre estadio T y éxitus tumor específico.

4.3.3. Relación entre Gleason y metástasis

Se aprecia una relación significativa entre el grado de Gleason y la presencia de metástasis, así como entre éste y los éxitus tumor específico (Tablas 32 y 33).

	M0	M1	Total
Gleason 2 - 4	14	1	15
Gleason 5 -7	4	3	7
Gleason 8 - 10	0	1	1
Total	18	5	23

p= 0,024

Tabla 32: Relación entre grado de Gleason y presencia de metástasis.

	No	Si	Total
Gleason 2 - 4	15	0	15
Gleason 5 -7	4	3	7
Gleason 8 - 10	0	1	1
Total	19	4	23

p= 0,004

Tabla 33: Relación entre grado de Gleason y éxitus tumor específico.

4.3.4. Relación entre niveles séricos de VEGF, grado de Gleason, estadio clínico, presencia de metástasis, edad, niveles séricos de PSA y éxitus

No se ha encontrado relación significativa entre los niveles de VEGF sérico con el grado de Gleason y estadio clínico tumoral en el grupo A.

Sin embargo, si que se ha apreciado una relación significativa ($p= 0,035$) entre los niveles séricos de VEGF y la presencia de metástasis (Tablas 34, 35 y 36).

	Mediana	Mínimo	Máximo
Gleason 2-4	1021,00	31,20	2500,00
Gleason 5-7	456,06	169,00	2500,00
Gleason 8-10	1281,54	1281,54	1281,54

$p= 0,305$

Tabla 34: Relación entre niveles séricos de VEGF y grado de Gleason en el grupo A.

	Mediana	Mínimo	Máximo
T1c	1150,29	660,00	2500,00
T2a	473,54	31,20	1768,60
T3a	233,54	233,54	233,54
T3b	1623,00	964,00	2282,00
T3c	868,80	456,06	1281,54

$p= 0,164$

Tabla 35: Relación entre niveles séricos de VEGF y estadio en el grupo A.

	Mediana	Mínimo	Máximo
M0	509,00	3,24	2500,00
M1	1281,54	456,06	2500,00

$p= 0,035$

Tabla 36: Relación entre niveles séricos de VEGF y presencia de metástasis.

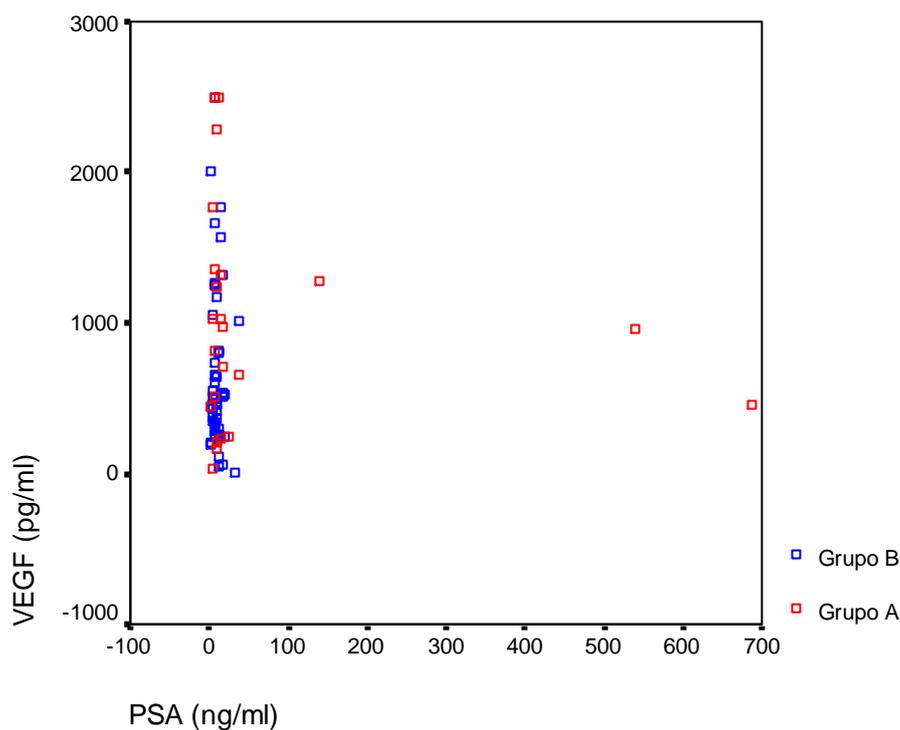


Figura 8: Relación entre valores séricos de VEGF y de PSA en ambos grupos.

PSA	Mediana	Mínimo	Máximo
<=4	443,48	190,68	2000,00
>4 - <=10	509,00	31,20	2500,00
>10	660,00	3,24	2500,00

p= 0,62

Tabla 37: Relación entre VEGF y PSA agrupado en ambos grupos.

No se ha apreciado correlación significativa entre los niveles séricos de VEGF y la edad de los pacientes ($p= 0,920$) ni con los niveles séricos de PSA (Figura 8) ($p= 0,657$), aunque se han encontrado valores algo mayores en el grupo de PSA $> 10,0$ ng/ml (Tabla 37).

No se ha observado una relación significativa entre los niveles de VEGF y los éxitos tumor específicos ($p= 0,96$).

4.3.5. Relación entre niveles urinarios de bFGF, grado de Gleason, estadio clínico, presencia de metástasis, edad, niveles séricos de PSA y éxitus

En las tablas 38, 39 y 40 observamos que no se ha hallado relación significativa entre los niveles urinarios de bFGF y el grado de Gleason ($p= 0,350$) ni estadio ($p= 0,309$) en el grupo A así como con la presencia de metástasis ($p= 0,162$).

	Mediana	Mínimo	Máximo
Gleason 2-4	0,43	0,25	17,62
Gleason 5-7	0,42	0,23	13,76
Gleason 8-10	13,71	13,71	13,71

$p= 0,350$

Tabla 38: Relación entre niveles urinarios de bFGF y grado de Gleason en el grupo A.

	Mediana	Mínimo	Máximo
T1c	0,36	0,23	3,48
T2a	0,46	0,23	17,62
T3a	0,35	0,35	0,35
T3b	0,50	0,49	0,50
T3c	13,74	13,71	13,76

$p= 0,309$

Tabla 39: Relación entre niveles urinarios de bFGF y estadio en el grupo A.

	Mediana	Mínimo	Máximo
M0	0,52	0,21	31,62
M1	7,11	0,49	13,76

$p= 0,162$

Tabla 40: Relación entre niveles urinarios de bFGF y presencia de metástasis.

No se ha apreciado correlación estadísticamente significativa entre los niveles urinarios de bFGF y la edad de los pacientes ($p= 0,782$) ni con los niveles séricos de PSA (Figura 9 y tabla 41), ($p= 0,075$ y $p= 0,21$). Tampoco se ha apreciado relación significativa entre los niveles urinarios de bFGF y los éxitos tumor específicos ($p= 0,28$).

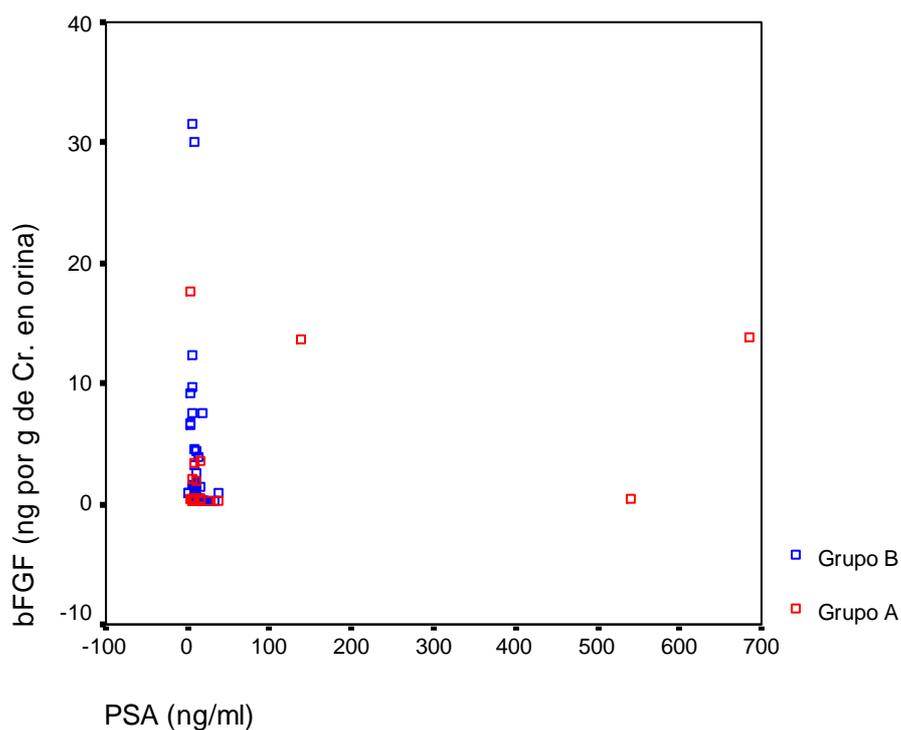


Figura 9: Relación entre los valores urinarios de bFGF y PSA en ambos grupos.

PSA	Mediana	Mínimo	Máximo
≤ 4	3,74	0,41	9,15
$>4 - \leq 10$	0,50	0,24	31,62
>10	0,49	0,21	13,76

$p= 0,21$

Tabla 41: Relación entre bFGF urinario y PSA agrupado.

4.3.6. Curva ROC del PSA para ambos grupos de estudio

En la siguiente figura observamos que no se alcanza significación estadística para distinguir entre ambos grupos de estudio por el valor del PSA sérico.

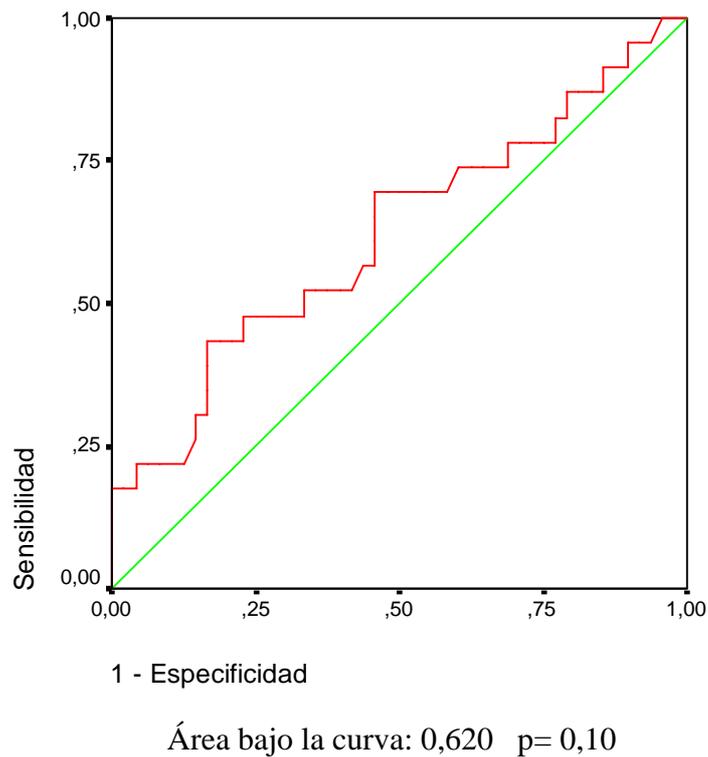


Figura 10: Curva de rendimiento diagnóstico del PSA para ambos grupos de estudio.

4.3.7. Curva ROC del PSA para la presencia de metástasis

En la figura 11 se observa que esta curva no llega a alcanzar la suficiente área bajo la curva para adquirir significación estadística.

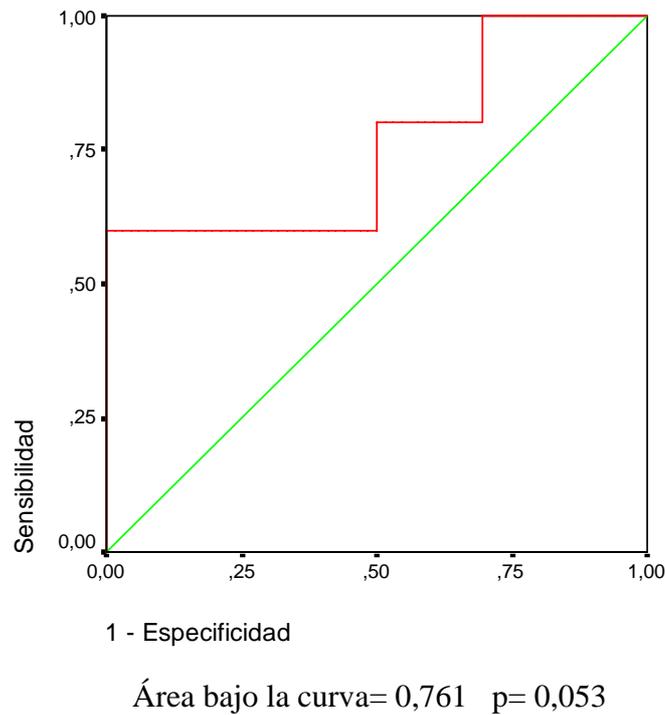


Figura 11: Curva de rendimiento diagnóstico del PSA para la presencia de metástasis.

4.3.8. Curvas ROC de VEGF y bFGF para ambos grupos de estudio

Como puede apreciarse en las figuras 12 y 13, ni VEGF y mucho menos bFGF tienen suficiente rendimiento diagnóstico para discriminar entre ambos grupos de pacientes.

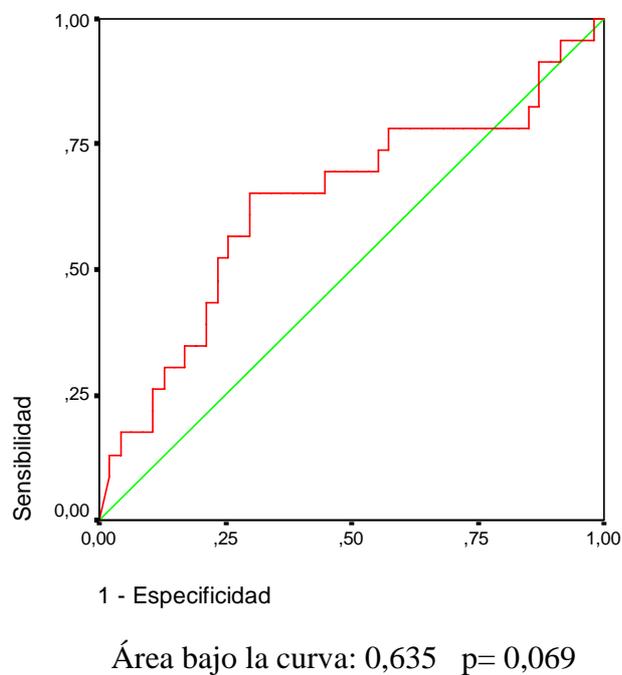


Figura 12: Curva ROC de VEGF para los grupos A y B.

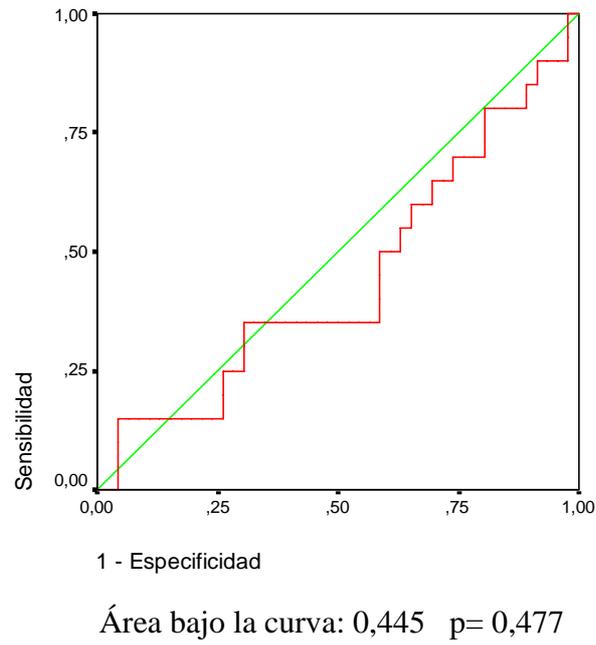
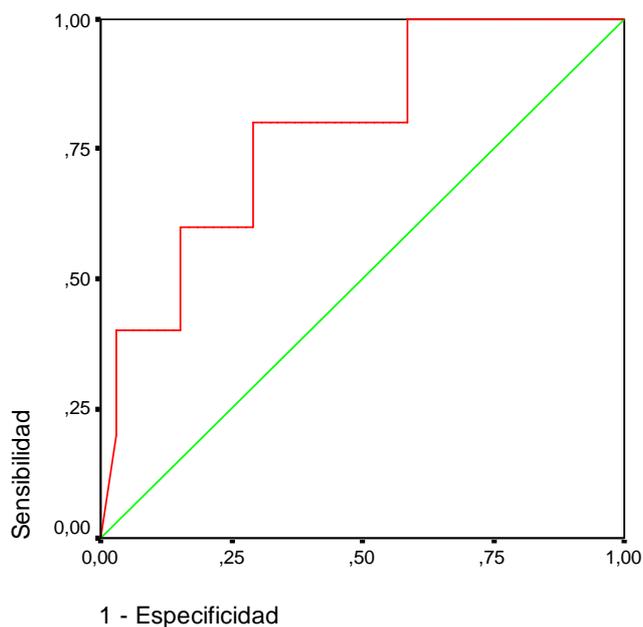


Figura 13: Curva ROC de bFGF para los grupos A y B.

4.3.9. Curvas ROC de VEGF y bFGF para la presencia de metástasis

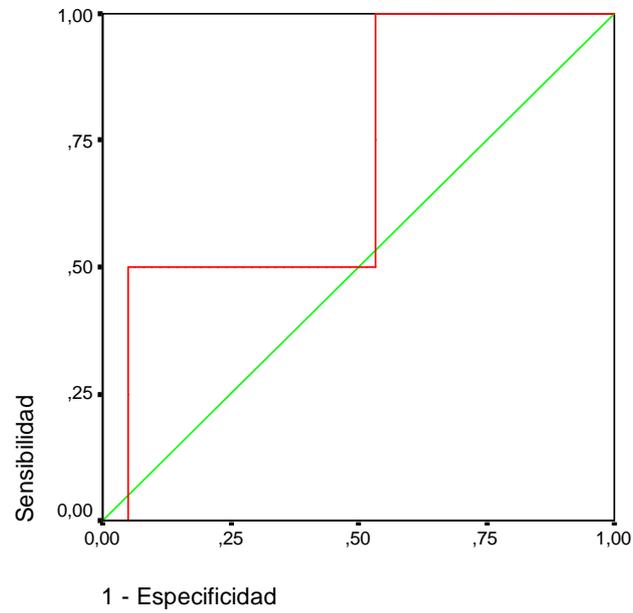
En las figuras 14 y 15 están reflejadas las curvas de rendimiento diagnóstico para ambos factores de crecimiento en relación con la presencia o no de metástasis. Observamos que VEGF si que presenta un área bajo la curva adecuada y con significación estadística ($p= 0,035$) para discriminar entre pacientes con presencia de metástasis y los que no. El valor de VEGF de máxima sensibilidad (80%) y especificidad (70,8%) se situa según esta curva en 891,00 pg/ml.

No sucede lo mismo con bFGF en el que no se aprecia una relación estadísticamente significativa en su curva ROC ($p= 0,162$).



Área bajo la curva: 0,785 $p= 0,035$.

Figura 14: Curva ROC de VEGF para la presencia de metástasis.



Área bajo la curva: 0,710 p= 0,162.

Figura 15: Curva ROC de bFGF para la presencia de metástasis.

4.3.10. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA

Se han realizado curvas de supervivencia en relación con el PSA agrupado y el punto de corte obtenido en las curvas ROC para VEGF.

Curvas de supervivencia para el PSA agrupado

En la figura 16 observamos que existe una relación significativa entre la supervivencia y el PSA agrupado (Log Rank= 0,04). La supervivencia es mayor entre los pacientes con niveles séricos de PSA ≤ 4 ng/ml y entre 4 - ≤ 10 ng/ml.

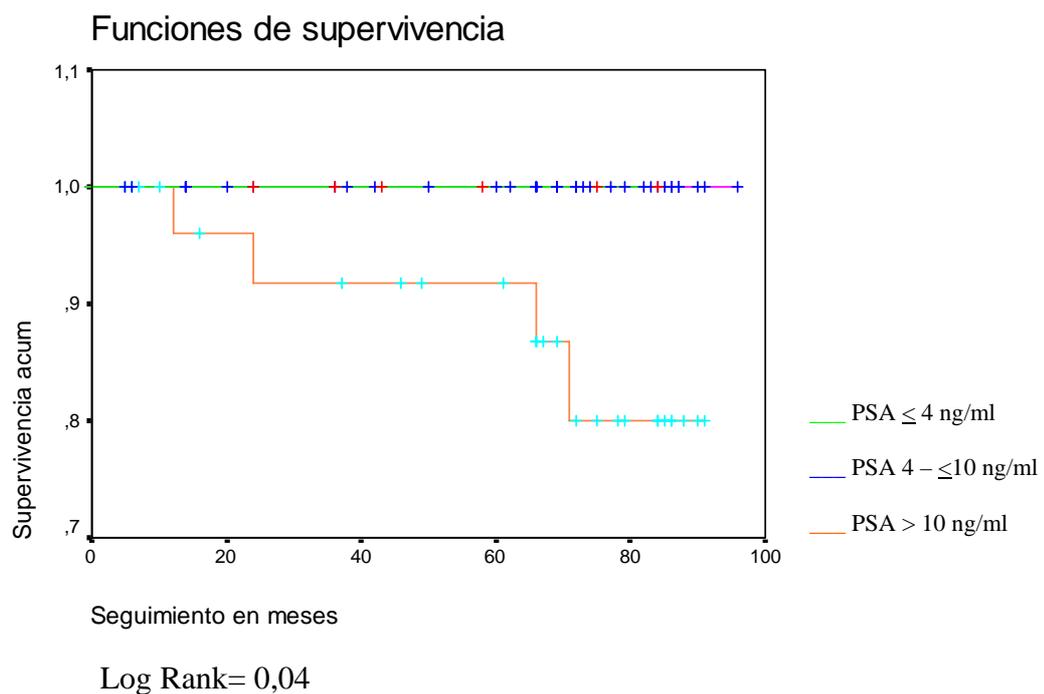


Figura 16: Curva de supervivencia para el PSA agrupado.

Curvas de supervivencia para el punto de corte de VEGF= 891,00 pg/ml

En la curva de supervivencia realizada tomando como punto de corte el valor de máxima sensibilidad y especificidad de VEGF para la detección de metástasis (Figura 17), obtenido en las curvas ROC, no se aprecia una relación significativa entre la supervivencia y este valor (Log Rank= 0,51).

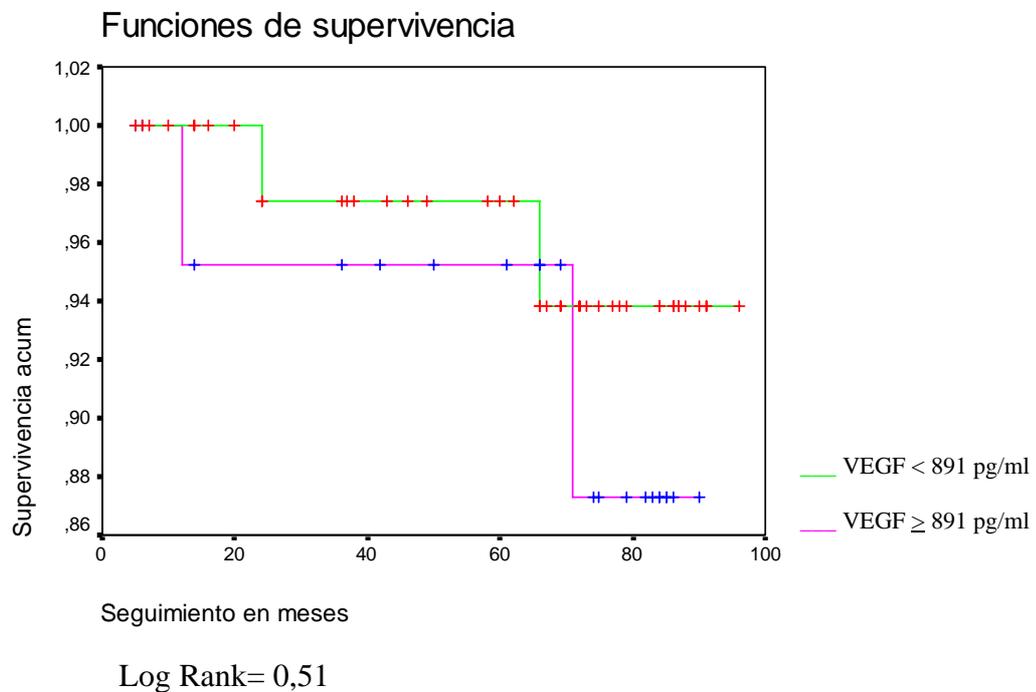


Figura 17: Curva de supervivencia para el punto de corte de VEGF= 891,00 pg/ml.

5. DISCUSIÓN

El PSA es una glucoproteína secretada por las células lumbinales del epitelio prostático y está establecido en la actualidad como el marcador más importante en el cáncer de próstata ⁽⁴⁵⁾.

Sin embargo, su principal inconveniente es la falta de especificidad ⁽⁴⁵⁾. No tiene la suficiente especificidad para distinguir entre pacientes con HBP y cáncer de próstata, en especial cuando el tacto rectal es normal y su valor sérico menor de 10,0 ng/ml. Tampoco tiene la suficiente sensibilidad y especificidad para predecir con exactitud qué tumores están localizados en la glándula y cuál va a ser la evolución de la enfermedad en cada paciente ^(13, 396).

Respecto a la falta de especificidad del PSA, Wolff et al. ⁽⁴⁹⁾ confirman en su revisión la modesta capacidad de discriminación de los valores séricos de PSA entre pacientes con HBP y cáncer de próstata. En el grupo de pacientes con HBP el 22,3% de los mismos tenían valores de PSA mayores de 10,0 ng/ml. También observaban un importante solapamiento de los valores individuales de PSA en los dos grupos y éstos tendían a agruparse por debajo de 10,0 ng/ml (HBP: 78%; cáncer de próstata: 45%).

En nuestro trabajo observamos que el 35,4% de pacientes del grupo de HBP tiene valores de PSA mayores de 10,0 ng/ml.

Apreciamos también el solapamiento de los valores en ambos grupos, así el 64,6% de pacientes con HBP y el 47,8% de pacientes con cáncer de próstata presenta valores de PSA inferiores a 10,0 ng/ml.

Además, el 43,4% de pacientes con cáncer de próstata y el 54,2% de pacientes con HBP tiene valores de PSA entre 4,1 y 10,0 ng/ml.

En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas entre las medianas de valores del PSA sérico en ambos grupos de estudio ni tampoco con el estadio clínico T ni con la presencia de metástasis.

Si se han encontrado diferencias significativas con el grado de Gleason en el grupo de pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de próstata, con valores mayores de PSA sérico cuando mayor era el grado de Gleason ($p= 0,039$).

También se ha encontrado relación entre niveles más elevados de PSA con los éxitos tumor dependientes ($p= 0,003$) y la curva de supervivencia es significativa si se relaciona con los valores de PSA agrupados (Log Rank= 0,04).

Como se ha indicado en la introducción los factores peptídicos de crecimiento son secretados tanto por las células del estroma como las del epitelio de la próstata y ayudan a regular el crecimiento de ésta. Se ha demostrado la existencia de alteraciones en la producción de factores de crecimiento y en la expresión de sus receptores en modelos experimentales de muchos tumores. Estas alteraciones se han propuesto como un mecanismo para explicar el crecimiento tisular incontrolado del cáncer.

Por otro lado, también hemos destacado que la angiogénesis es necesaria para el crecimiento tumoral. Hay evidencias indirectas bien documentadas de que el crecimiento tumoral es angiogénesis dependiente y que los factores de crecimiento regulan esta neovascularización. En este sentido, se ha observado en modelos experimentales de cáncer de próstata que VEGF y bFGF juegan un papel fundamental.

En el presente estudio hemos determinado las concentraciones séricas de VEGF y las urinarias de bFGF en una serie de pacientes con indicación de biopsia prostática por sospecha de neoplasia de próstata y se han relacionado con marcadores diagnósticos y pronósticos reconocidos, realizando un estudio transversal en el momento del diagnóstico para intentar averiguar si pueden aportar información diagnóstica y/o pronóstica adicional y posteriormente se ha estudiado su relación con la mortalidad en los ocho primeros años de seguimiento.

Hemos observado que ambos grupos presentan diferencias de edad estadísticamente significativas ($p < 0,05$), lo cual refleja lo observado normalmente en la práctica clínica y en estudios en los que se relacionan estos factores de crecimiento con grupos similares ^(15, 288, 381).

Se ha comprobado que las tasas séricas de VEGF no muestran relación con la edad siendo independientes de ésta ⁽²⁸⁸⁾. Por ejemplo, Yamamoto et al. ⁽³⁹⁷⁾ estudiaron 184 pacientes sanos con edades comprendidas entre los 29 a 59 años y no encontraron relación entre los niveles circulantes de VEGF y la edad.

Kumar et al. ⁽²⁹⁰⁾ tampoco encuentran relación con la edad en un grupo control de 136 sanos estudiando niveles séricos de VEGF en relación al cáncer colorectal. En este mismo estudio además observan que no existe relación entre varones y mujeres, aunque este problema obviamente no se plantea en nuestro estudio es muy

importante tenerlo en cuenta en algunos factores de crecimiento en los que sí que puede existir esta relación como más adelante veremos.

Tampoco se ha encontrado relación entre la edad y los niveles séricos y/o urinarios de bFGF en la literatura revisada ^(148, 380).

En nuestro estudio no hemos observado una relación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de VEGF y los urinarios de bFGF con la edad ($p= 0,920$ y $p= 0,782$ respectivamente).

Se ha comprobado la presencia de niveles séricos más elevados de VEGF en pacientes con una variedad de cánceres que en la población normal y con una correlación positiva con la presencia de enfermedad metastásica ^(288, 291), sin embargo respecto a la relación de los niveles séricos de VEGF y urinarios de bFGF con la HBP y adenocarcinoma de próstata encontramos resultados contradictorios.

A continuación hacemos una revisión de los estudios en los que se ha relacionado VEGF y bFGF entre grupos de pacientes con patología prostática.

Hay que señalar que muchos de estos estudios son difícilmente comparables ya que aunque se han determinado los factores de crecimiento con los mismos kits comerciales que en nuestro estudio, no hay uniformidad a la hora de determinar el compartimento sanguíneo (suero, plasma, sangre total) y/o urinario en el que se realiza el análisis.

El VEGF circulante tiene un origen multicompartmental; así procede del tumor, pero puede ser liberado también por plaquetas, granulocitos, monocitos y linfocitos ⁽³⁹⁸⁻⁴⁰¹⁾.

Hay estudios que han demostrado una relación directa entre el recuento plaquetario y la concentración sérica de VEGF, de forma que puede reflejar más el recuento plaquetario que la carga tumoral ⁽⁴⁰¹⁾.

Se ha observado una asociación entre la agregación plaquetaria *in vitro* y las concentraciones de VEGF demostrando que la proporción de VEGF liberado de las plaquetas durante la formación del coágulo es la fuente principal de VEGF en las muestras de suero ⁽⁴⁰²⁾.

Se ha comunicado que los niveles séricos de VEGF aumentaban de manera variable a lo largo de dos horas durante la coagulación a temperatura ambiente, manteniéndose estable posteriormente ^(397, 401, 403).

De todas formas una situación similar ocurre en las determinaciones plasmáticas de VEGF, en las que inicialmente parecía existir mayor efectividad para diferenciar a los voluntarios sanos y pacientes con procesos no neoplásicos de los pacientes oncológicos^(398, 404). Se han determinado niveles plasmáticos de factor plaquetario 4 (PF4), por lo que los valores apreciados en voluntarios sanos podrían ser debidos a una activación parcial de las plaquetas *in vitro*, haciendo cuestionable la conclusión sobre el papel de VEGF plasmático como marcador tumoral⁽⁴⁰⁵⁾.

Lee et al.⁽⁴⁰⁶⁾ sugieren que aunque es cierto que los niveles séricos de VEGF dependen del recuento de plaquetas, la proporción de VEGF derivado de las mismas también refleja la biología de las células tumorales, ya que se ha observado que las células tumorales circulantes forman complejos con las plaquetas, por tanto los niveles séricos podrían ser más útiles como medida de VEGF circulante para el pronóstico de pacientes con cáncer.

Por tanto, es un problema no resuelto actualmente qué compartimento sanguíneo es el ideal para realizar las determinaciones de VEGF⁽⁴⁰³⁾. El segundo consenso internacional para la metodología y criterios de la evaluación de la cuantificación de la angiogénesis en tumores sólidos humanos aunque recomienda la determinación sistemática en plasma, suero y sangre total, precisa que sigue siendo necesaria la realización de estudios clínicos prospectivos y controlados que clarifiquen en qué compartimento sanguíneo deben realizarse las determinaciones⁽⁴⁰⁵⁾.

Respecto a bFGF tampoco hay uniformidad a la hora de establecer el compartimento en el cual se determina. En algún estudio como el de Kohli et al.⁽⁴⁰⁷⁾ determinan VEGF y bFGF en plasma, así como bFGF en orina ya que fue indetectable en plasma.

Duque et al.⁽²⁸⁸⁾ fueron los primeros en medir niveles circulantes de VEGF en pacientes con HBP y cáncer de próstata. Encontraron que niveles elevados de VEGF en plasma se asociaban a enfermedad metastásica. Proponen la hipótesis de que los niveles plasmáticos de VEGF pueden ser útiles como marcadores de enfermedad diseminada. De todas formas, también encontraron un pequeño grupo de pacientes con enfermedad localizada y niveles elevados de VEGF, sin poder dar una explicación clara.

Hay un estudio que ha demostrado descensos significativos de los niveles plasmáticos de VEGF tras la realización de una prostatectomía radical por cáncer de próstata clínicamente localizado, sugiriendo que la producción prostática de VEGF puede contribuir de una forma sustancial al total de VEGF plasmático ⁽⁴⁰⁸⁾.

Walsh et al.⁽¹⁵⁾ no encuentran diferencias significativas de los valores séricos de VEGF y de bFGF determinados en un grupo de pacientes con HBP y con adenocarcinoma de próstata y además no encuentran una tendencia a valores superiores en el segundo grupo. Esto contradice los resultados de Meyer et al.⁽³⁸¹⁾ que hallan niveles superiores de bFGF en pacientes con cáncer de próstata respecto al grupo de pacientes con HBP.

Jones et al.⁽⁴⁰⁹⁾ tampoco observan diferencias significativas entre valores de VEGF en pacientes con HBP y con cáncer de próstata aunque si que observa una tendencia a encontrar valores más elevados en los pacientes con cáncer de próstata.

Kohli et al.⁽⁴⁰⁷⁾ encuentran niveles elevados de VEGF en plasma pobre en plaquetas en la mayoría de pacientes con cáncer de próstata avanzado aunque no encuentran relación significativa con un grupo de pacientes con cáncer de próstata con valores de PSA estables. Este autor también determina bFGF en orina ya que los niveles de bFGF en plasma fueron indetectables, sin encontrar ninguna relación significativa.

Nguyen et al.⁽³⁸⁰⁾ determinan niveles urinarios de bFGF en una extensa muestra de pacientes con diversos tipos de cáncer. Aunque detectan niveles elevados de bFGF en orina de algunos pacientes con cáncer de próstata no observan una diferencia significativa con los controles sanos, sólo encuentran relación significativa dentro de los tumores sólidos en los sarcomas y tumores de testículo.

Bok et al.⁽³⁴⁰⁾ no encuentran diferencias significativas en los niveles urinarios de bFGF en pacientes con cáncer de próstata hormonorefractario.

Cronauer et al.⁽¹⁴⁸⁾ hallan diferencias significativas entre niveles de bFGF pero entre pacientes con cáncer de próstata y pacientes sanos determinando bFGF en suero.

En nuestro estudio no se ha encontrado relación significativa entre las concentraciones séricas de VEGF en ambos grupos ($p= 0,069$), aunque si que hay una tendencia a encontrar valores superiores en el grupo de pacientes con adenocarcinoma de próstata.

Sin embargo, debemos destacar que si que hemos observado una relación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de VEGF y la presencia de metástasis ($p= 0,035$).

Respecto a los niveles urinarios de bFGF no hemos encontrado diferencias significativas entre ambos grupos ($p= 0,477$) ni una tendencia a valores superiores en el grupo de adenocarcinomas.

Tampoco se ha encontrado relación significativa con los niveles urinarios de bFGF y la presencia de enfermedad metastásica, aunque si que se apreciaban medianas superiores en los casos con metástasis.

Una posible explicación de la ausencia de relación en muchos estudios en los que se compara bFGF en orina entre grupos de pacientes con HBP y con cáncer de próstata u otros tumores urológicos la sugieren O'Brien et al.⁽³⁷⁷⁾, que recuerdan que bFGF es mitógeno no sólo para las células endoteliales sino también para los fibroblastos y células musculares lisas, y que bFGF juega un papel muy importante en la patogénesis de la HBP. En este estudio comparan niveles urinarios de bFGF en un grupo de pacientes de ambos sexos con tumores vesicales y un grupo control, observan que bFGF en orina tiene un mayor potencial diagnóstico cuando comparan ambos grupos y sólo lo analizan con mujeres, es decir las diferencias son más evidentes que cuando incluyen varones con medianas de edad de 70 años.

Otros autores como Trojan et al.⁽⁴¹⁰⁾, analizando VEGF, EGF y bFGF en muestras tisulares de cáncer de próstata concluyen que bFGF parece tener una papel menor que VEGF en la angiogénesis del cáncer de próstata.

Respecto a los valores de los factores de crecimiento obtenidos en otros estudios destacamos como Walsh et al.⁽¹⁵⁾ obtienen una mediana de VEGF de 206,00 pg/ml para los pacientes con cáncer de próstata avanzado y 241,00 pg/ml para el grupo de pacientes con HBP. Enjoi et al.⁽⁴¹¹⁾ obtienen una mediana de VEGF de 504,00 pg/ml en un grupo de pacientes con tumores de vías biliares y de 261,00 pg/ml en voluntarios sanos.

La mediana de los valores de VEGF en el grupo de pacientes con adenocarcinoma de próstata en nuestro estudio fue de 964,00 pg/ml (31,20 – 2500,00 pg/ml) y de 499,00 pg/ml (3,24 – 2500,00 pg/ml) en el grupo de pacientes con HBP.

La mediana de bFGF en orina en el estudio de Bok et al.⁽³⁴⁰⁾ fue de 1,62 ng/g de creatinina en el grupo de pacientes con cáncer de próstata.

En nuestro estudio fue de 0,46 ng/g de creatinina en el grupo de pacientes con cáncer de próstata y de 0,89 ng/g de creatinina en orina para el grupo de pacientes con HBP.

Todos estos estudios han utilizado una técnica de ELISA para la determinación de VEGF y bFGF del mismo fabricante que en nuestro caso por lo que las diferencias apreciadas sólo pueden atribuirse a una falta de estandarización en la fase preanalítica.

Estos mismos autores no encuentran una relación estadísticamente significativa entre VEGF y el grado de Gleason, independientemente que hayan encontrado diferencias con el grupo de pacientes sanos o con HBP o del medio (sangre u orina) en el que se ha determinado el factor de crecimiento^(15, 288).

Duque et al.⁽²⁸⁸⁾ si que encuentra una tendencia a valores más elevados en Gleason entre 8 y 10, aunque sin significación estadística.

Tampoco encuentran relación los autores que han estudiado bFGF con el grado de Gleason, sea cual sea la relación que hubieran encontrado con el grupo de pacientes sanos o con HBP e independientemente del medio en el que se analizara bFGF^(83, 148, 340, 381, 407).

En nuestro caso, no se ha encontrado una relación significativa entre los valores tanto de VEGF como de bFGF con el grado de Gleason en el grupo de pacientes con adenocarcinoma de próstata.

Si que hemos observado valores superiores de bFGF en Gleason entre 8 y 10 (bFGF= 13,71 ng/g de Cr en orina) aunque sin significación estadística.

Sucede lo mismo cuando se relacionan estos factores de crecimiento con el estadio clínico.

Duque et al.⁽²⁸⁸⁾ no encuentran relación entre VEGF y estadio clínico tumoral en el grupo de pacientes con cáncer de próstata.

Cronauer et al.⁽¹⁴⁸⁾ y Meyer et al.⁽³⁸¹⁾ tampoco encuentran relación entre bFGF y estadio clínico tumoral.

En nuestro estudio no se ha encontrado relación significativa entre los valores séricos de VEGF y urinarios de bFGF con el estadio clínico T.

Los autores citados tampoco encuentran relación significativa entre VEGF y los niveles de PSA, aunque Duque et al.⁽²⁸⁸⁾ observa valores significativamente elevados de VEGF en plasma en los pacientes con PSA > 20,0 ng/ml.

Cronauer et al.⁽¹⁴⁸⁾ no encuentra relación significativa entre los valores séricos de bFGF y los de PSA aunque observa tendencias a valores más elevados en los casos con PSA > 100,0 ng/ml.

En nuestro estudio no se hallado correlación significativa entre valores séricos de VEGF y de PSA, aunque hay una tendencia a valores algo mayores si se compara con el PSA agrupado.

No se ha observado una relación significativa entre los valores urinarios de bFGF y los valores séricos de PSA, más bien una tendencia a valores superiores en el grupo de pacientes con PSA \leq 4,0 ng/ml, aunque sin significación estadística ($p=0,21$).

Aunque no existen valores de referencia de normalidad establecidos para ninguno de los factores de crecimiento que hemos estudiado, se han intentado establecer en ocasiones puntos de corte en relación sobre todo a la capacidad de discriminación con la presencia de cáncer metastásico.

Así pues, Duque et al.⁽²⁸⁸⁾ establecen, mediante una regresión logística, un punto de corte para VEGF en 18,00 pg/ml en el cual el test demuestra una sensibilidad del 81% y una especificidad del 71% en el diagnóstico de cáncer metastásico, en un grupo de estudio de 80 pacientes.

Meyer et al.⁽³⁸¹⁾ establecen un punto de corte, aunque de forma arbitraria, en 1,00 pg/ml para bFGF en suero mediante el que obtiene una sensibilidad del 83% pero una especificidad del 44% para la detección de cáncer.

En nuestro estudio mediante la realización de curvas de rendimiento diagnóstico (curvas ROC) para VEGF y bFGF en relación a la discriminación entre HBP y cáncer de próstata no encontramos un área bajo la curva con significación

estadística para poder establecer un punto de corte para distinguir entre ambos grupos.

Sin embargo, realizando las curvas de rendimiento diagnóstico para VEGF respecto a la detección de metástasis observamos que se obtiene un área bajo la curva con significación estadística ($p= 0,035$). De acuerdo con esta curva obtenemos el punto de corte de 891,00 pg/ml de VEGF como el de máxima sensibilidad (80%) y especificidad (70,8%) para la detección de enfermedad metastásica.

Considerando este punto de corte como referencia para calcular la curva de supervivencia de Kaplan-Meier tumor-específica no encontramos significación estadística respecto a este valor (Log Rank= 0,51).

La curva de rendimiento diagnóstico de bFGF respecto a la detección de metástasis no presenta un área bajo la curva adecuada para tener significación ($p=0,162$).

En el presente trabajo evidenciamos que niveles elevados de VEGF en suero se asocian a pacientes con cáncer de próstata metastásico.

La medición de los niveles de VEGF puede ser útil como marcador de enfermedad diseminada y puede añadir información adicional pronóstica a la proporcionada por el grado de Gleason, estadio clínico y PSA sérico, aunque hacen falta estudios prospectivos con tamaños muestrales mucho mayores para determinar qué medio humoral es el ideal para calcular estos niveles y cómo puede ser utilizado como una herramienta más en el manejo y seguimiento de pacientes con cáncer de próstata así como medida de respuesta al tratamiento y agresividad del tumor.

6. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. Se ha encontrado una relación significativa entre los niveles séricos de VEGF y la presencia de metástasis.
2. No se observado una relación significativa de las concentraciones séricas de VEGF entre los pacientes con patología benigna y maligna de próstata.
3. No se han apreciado relaciones significativas entre los niveles séricos de VEGF y los niveles séricos de PSA, edad de los pacientes, estadio clínico tumoral y grado de Gleason.
4. No se ha observado relación significativa entre los niveles séricos de VEGF y la mortalidad cáncer específica.
5. No se ha apreciado relación significativa de los niveles urinarios de bFGF entre los pacientes con patología benigna y maligna de próstata.
6. No se han apreciado relaciones significativas entre los niveles urinarios de bFGF y los niveles séricos de PSA, edad de los pacientes, estadio clínico tumoral, grado de Gleason y presencia de metástasis.
7. No se ha observado relación significativa entre los niveles urinarios de bFGF y la mortalidad cáncer específica.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ruibal A. Marcadores tumorales. Historia, definición y clasificación. *Laboratorio* 1984;78(467):379-386.
2. Pirtskhalaishvili G, Hrebinko RL, Nelson JB. The treatment of prostate cancer. An overview of current opinions. *Cancer Practice* 2001;9(6):295-306.
3. Borre M, Nerstrom B, Overgaard J. The natural history of prostate carcinoma based on a Danish population treated with no intent to cure. *Cancer* 1997;80:917-928.
4. Hellowell GO, Brewster SF. Growth factors and their receptors in prostate cancer. *BJU International* 2002;89:230-240.
5. Djavan B, Remzi M, Ghawidel K, Marbetger M. Diagnosis of prostate cancer: the clinical use of transrectal ultrasound and biopsy. *EAU Update Series* 2003;1:9-15.
6. Foster CS, Lonford P, Forsyth L, Djamgoz MBA, Ke Y. Las bases celulares y moleculares del cáncer de próstata. *BJU International* 1999;83(Edición española):171-194.
7. Griffiths K, Morton MS. Aspects of the cell biology of prostate cancer. En: Griffiths K, editor. *Textbook of prostate cancer. Pathology, diagnosis and treatment*. Londres: Martin Dunitz Ltd; 1999. p. 51-74.
8. Montie JE, Meyers SE. Defining the ideal tumor marker for prostate cancer. *Urol Clin North Am* 1997;24(2):247-252.
9. Sokoll LJ, Chan DW. Prostate-specific antigen. Its discovery and biochemical characteristics. *Urol Clin North Am* 1997;24(2):253-259.

10. Cózar Olmo JM, Tallada Buñuel M, Casares Arias A, Blanco Martínez N, Espejo Maldonado E, Vicente Prados J, et al. Utilidad de la densidad de PSA y PSA libre/total en el diagnóstico del cáncer de próstata en pacientes con tacto rectal normal. *Urol Integr Invest* 1998;3:178-185.
11. Vastag B. Some promising biomarkers for cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(10):788.
12. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(14):1054-1061.
13. Morote J. Cuantificación de la isoforma compleja del antígeno prostático específico (PSAc). Un nuevo reto en la era PSA. *Med Clin (Barc)* 2004;122(7):256-258.
14. Catalona WJ, Ramos CG, Carvalhal GF, Yan Y. Lowering PSA cutoffs to enhance detection of curable prostate cancer. *Urology* 2000;55:791-795.
15. Walsh K, Sherwood RA, Dew TK, Mulvin D. Angiogenic peptides in prostatic disease. *BJU International* 1999;84:1081-1083.
16. Vera Donoso CD, Broseta Rico E, Jimenez Cruz JF. Marcadores en el cáncer prostático: introducción y fosfatasa ácida prostática. En: *Marcadores en urología*. Madrid: ENE Ediciones; 1993. p. 67-92.
17. Vera Donoso CD, Broseta Rico E, Jiménez Cruz JF. Marcadores tumorales en urología: consideraciones generales. En: *Marcadores en urología*. Madrid: ENE Ediciones; 1993. p. 11-15.

18. Duffy MJ, McGing P, McSweeney J. Guidelines for the use of tumour markers: Association of Clinical Biochemists in Ireland; 2000. Disponible en: URL: <http://www.iol.ie/deskenny/acbi.html>.
19. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP. Purification of a human prostatic specific antigen. *Invest Urol* 1979;17:159-163.
20. Diamandis EP, He Yu. Nonprostatic sources of prostate specific antigen. *Urol Clin North Am* 1997;24(2):275-282.
21. Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. *Cancer Res* 1980;40(7):2428-2432.
22. Wang MC, Papsidero LC, Kuriyama M. Prostate antigen: a new potential marker for prostatic cancer. *Prostate* 1981;2:89-94.
23. Hamdy FC, Johnson MI, Robson CN. Prostate cancer. En: George NJR, editor. *The scientific basis of urology*. Londres: Isis Medical Media; 1999. p. 355-373.
24. Vera Donoso CD, Broseta Rico E, Jiménez Cruz JF. Antígeno prostático específico y otros marcadores. En: *Marcadores en Urología*. Madrid: ENE Ediciones; 1993. p. 77-92.
25. Pritzker KPH. Cancer biomarkers: easier said than done. *Clin Chem* 2002;48(8):1147-1150.
26. Torrubia Romero FJ, Cruz Navarro N, Pascual del Pobil JL. Factores de crecimiento e hiperplasia benigna de próstata. *Rev Clin Esp* 1999;199 Supl 2:19-23.

27. Solé Balcells F, Chéchile G, Algaba F, Villavicencio H. Factores de crecimiento. Su papel en el desarrollo celular normal y en el cáncer. En: *Biología molecular de los tumores urológicos*. Madrid: ENE Ediciones; 1995. p. 87-95.
28. Mikolajczyk SD, Song Y, Wong JR, Matson RS, Rittenhouse HG. Are multiple markers the future of prostate cancer diagnosis? *Clin Biochem* 2004;37:519-528.
29. Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol* 2003;21(2):383-391.
30. Yousef GM, Diamandis EP. The new human tissue kallikrein gene family: Structure, function, and association to disease. *Endocr Rev* 2001;22:184-204.
31. Lilja H. Biology of prostate-specific antigen. *Urology* 2003;62(Supl 5A):27-33.
32. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: Kallikreins, kininogens, and kininasas. *Pharmacol Rev* 1992;44:1-80.
33. Takayama TK, Carter CA, Deng T. Activation of prostate-specific antigen precursor (pro-PSA) by prostin, a novel human prostatic serine protease identified by degenerate PCR. *Biochemistry* 2001;40:1679-1687.
34. Magklara A, Scorilas A, Catalona WJ, Diamandis EP. The combination of human glandular kallikrein and free prostate specific antigen (PSA) enhances discrimination between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in patients with moderately increased total PSA. *Clin Chem* 1999;45:1960-1966.
35. Riegman PH, Vliestra RJ, van der Korput JA. The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element. *Mol Endocrinol* 1991;5:1921-1930.

36. Magklara A, Scorilas A, Stephan C. Decreased concentrations of prostate-specific antigen and human kallikrein 2 in malignant versus nonmalignant prostatic tissue. *Urology* 2000;56:527-532.
37. Sun Z, Pan J, Balk SP. Androgen receptor-associated protein complex binds upstream of the androgen-responsive elements in the promoters of human prostate-specific antigen and kallikrein 2 genes. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3318-3325.
38. Eisenberg MA, Blumenstein BA, Crawford ED. Bilateral orchiectomy with or without flutamide for metastatic prostate cancer. *N Eng J Med* 1998;339:1036-1042.
39. Takayama TK, Fujikawa K, Davie EW. Characterization of the precursor of prostate-specific antigen. Activation by trypsin and by human glandular kallikrein. *J Biol Chem* 1997;272:21582-21588.
40. Mikolajczyk SD, Catalona WJ, Evans CL, Linton HJ, Millar LS, Marker KM, et al. Proenzyme forms of prostate-specific antigen in serum improve the detection of prostate cancer. *Clin Chem* 2004;50(6):1017-1025.
41. Mikolajczyk SD, Millar LS, Wang TJ. "BPSA," a specific molecular form of free prostate-specific antigen, is found predominantly in the transition zone of patients with nodular benign prostatic hyperplasia. *Urology* 2000;55:41-45.
42. Armbruster DA. Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application. *Clin Chem* 1993;39(2):181-195.
43. Graves HC. Nonprostatic sources of prostate-specific antigen: a steroid hormone-dependent phenomenon? *Clin Chem* 1995;41(1):7-9.
44. Stenman UH, Leinonen J, Zhang WM, Finne P. Prostate-specific antigen. *Semin Cancer Biol* 1999;9(2):83-93.

45. Schmid H-P, Prikler L, Sturgeon CM, Semjonow A. Diagnosis of prostate cancer. The clinical use of prostate specific antigen. EAU Update Series 2003;1:3-8.
46. Semjonow A, De Angelis G, Oberpenning F, Schmid H-P, Brandt B, Hertle L. The clinical impact of different assays for prostate specific antigen. BJU International 2000;86:590-597.
47. Price CP, Allard J, Davies G, Dawnay A, Duffy MJ, France M, et al. Pre- and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer. Ann Clin Biochem 2001;38(Pt 3):188-216.
48. Hudson MA, Bahnson RR, Catalona WJ. Clinical use of prostate specific antigen in patients with prostate cancer. J Urol 1989;142(4):1011-1017.
49. Wolff JM, Boeckmann W, Borchers H, Handt St, Rieneke Th, Jakse G. Prostate-specific antigen: insufficient discrimination between benign prostatic hyperplasia and organ-confined prostate cancer. Urol Int 1996;57:170-174.
50. Klotz L. PSAdynia and other PSA-related syndromes: a new epidemic-a case history and taxonomy. Urology 1997;50:831-832.
51. Babaian RJ, Fritsche HA, Evans RB. Prostate-specific antigen and prostate glandular volume: correlation and clinical application. J Clin Lab Anal 1990;4(2):135-137.
52. Veneziano S, Pavlica P, Querze R, Nanni G, Lalanne MG, Vecchi F. Correlation between prostatic-specific antigen and prostate volume, evaluated by transrectal ultrasonography: usefulness in diagnosis of prostate cancer. Eur Urol 1990;18:112-116.

53. Kalish J, Cooner WH, Graham Jr SD. Serum PSA adjusted for volume of transition zone (PSAT) is more accurate than PSA adjusted for total gland volume (PSAD) in detecting adenocarcinoma of the prostate. *Urology* 1994;43:601-606.
54. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA, et al. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *Jama* 1993;270(7):860-864.
55. Lilja H, Christensson A, Dahlen U, Matikainen M-T, Nilsson O, Pettersson K, et al. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clin Chem* 1991;37:1618-1625.
56. Stenman U-H, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O. A complex between prostate-specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res* 1991;51:222-226.
57. Allard WJ, Zhou Z, Yeung KK. Novel immunoassay for the measurement of complexed prostate-specific antigen in serum. *Clin Chem* 1998;44:1216-1223.
58. Huber PR, Schmid H-P, Mattarelli G, Strittmatter B, van Steenbrugge GJ, Maurer A. Serum free prostate-specific antigen: isoemzymes in benign hyperplasia and cancer of the prostate. *Prostate* 1995;27:212-219.
59. Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, Brant LJ, Chan DW, Andres R, et al. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *Jama* 1992;267(16):2215-2220.
60. Schmid H-P, McNeal JE, Stamey TA. 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;71:2031-2040.

61. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen D, Yuan JJ, et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Eng J Med* 1991;324(17):1156-1161.

62. Oesterling JE. Prostate-specific antigen: a critical assesment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* 1991;145(5):907-923.

63. Sanz Vélez JI, Gil Sanz MJ, Allepuz Losa C, Rioja Sanz LA. Cáncer de próstata. Aspectos actuales del diagnóstico. *Actas Urol Esp* 1991;15(6):518-526.

64. Babaian RJ, Camps JL. The role of prostate specific antigen as part of the diagnostic trial and as a guide when to perform a biopsy. *Cancer* 1991;68:2060-2063.

65. Otto SJ, de Koning HJ. Update on screening and early detection of prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2004;14:151-156.

66. Aziz DC, Barathur RB. Prostate specific antigen and prostate volume: a meta-analysis of prostate cancer screening criteria. *J Clin Lab Anal* 1993;7:283-292.

67. Martínez Jabaloyas JM, García Morata F, Villamón Fort R, Pastor Hernández F, Gil Salom M, García Sisamón F. Valor de la densidad del antígeno prostático específico y de la densidad del antígeno prostático específico de la zona transicional en el diagnóstico del cáncer de próstata. *Actas Urol Esp* 2003;27(6):442-449.

68. Morote J, Raventós CX, Lorente JA, López-Pacios MA, Encabo G, De Torres I, et al. Comparison of percent free prostate specific antigen and prostatic antigen density as methods to enhance prostate specific antigen specificity in early prostate

cancer detection in men with normal digital rectal examination and prostate specific antigen between 4,1 and 10 ng/ml. *J Urol* 1997;158(2):502-504.

69. Jung K, Bruz B, Lein M, Kuabich A, Sinha P, Rudolph B, et al. Determination of alpha-1-antichymotrypsin-PSA complex in serum does not improve the differentiation between benign prostate hyperplasia and prostate cancer compared with total and percent free PSA. *Urology* 1999;53:1160-1168.

70. Brawer MK, Cheli CD, Nearman IE, Goldblatt J, Smith C, Schwartz MK, et al. Complexed prostate specific antigen provides significant enhancement of specificity compared with total prostate specific antigen for detecting prostate cancer. *J Urol* 2000;163:1476-1480.

71. Okegawa t, Kinjo M, Watanabe H, Kato M, Miyata A, Maciag T. The significance of free to complexed prostate specific antigen (PSA) ratio in prostate cancer detection in patients with a PSA level of 4,1 to 10 ng/ml. *BJU International* 2000;85:708-714.

72. Mitchell ID, Croal BL, Dickie A, Cohen NP, Ross I. A prospective study to evaluate the role of complexed prostate specific antigen and free/total prostate specific antigen ratio for the diagnosis of prostate cancer. *J Urol* 2001;165:1549-1553.

73. Miller MC, O'Dowd GP, Partin AW, Veltri RW. Contemporary use of complexed PSA and calculated percent free PSA for early detection of prostate cancer. *Urology* 2001;57:1105-1111.

74. Filella X, Alcover J, Molina R, Corral JM, Carretero P, Ballesta AM. Measurement of complexed PSA in the differential diagnosis between prostate cancer and benign prostate hyperplasia. *Prostate* 2000;42:181-185.

75. Filella X, Alcover J, Molina R, Beardo P, Ballesta AM. Free to complexed PSA ratio in differentiating benign prostate hyperplasia from prostate cancer. *Anticancer Res* 2001;21:3717-3720.

76. Okihara K, Cheli CD, Partin AW, Fritsche HA, Chan DW, Sokoll LJ. Comparative analysis of complexed prostate specific antigen, free prostatic specific antigen and their ratio in detecting prostate cancer. *J Urol* 2002;167:2017-2023.

77. Djavan B, Remzi M, Zlotta AR, Ravery V, Hammerer P, Reissgl A, et al. Complexed prostate specific antigen, complexed prostate specific antigen density of total and transitional zone, complexed/total prostate specific antigen ratio, free to total prostate specific antigen ratio, density of total and transition zone prostate specific antigen: results of the prospective multicenter European trial. *J Urol* 2001;60:4-9.

78. Partin AW, Brawer MK, Bartsch G, Horminger W, Taneja SS, Lepor H, et al. complexed prostate specific antigen improves specificity for prostate cancer detection: results of a prospective multicenter clinical trial. *J Urol* 2003;170:1787-1791.

79. Filella X, Truan D, Alcover J, Molina R, Luque P, Coca F, et al. Utilidad del antígeno prostático específico y sus fracciones en el diagnóstico del cáncer de próstata. *Med Clin (Barc)* 2004;122(7):241-244.

80. Stamey TA, Yemoto CE. Examination of the 3 molecular forms of serum prostate specific antigen for distinguish negative positive biopsy: relationship to transition zone volume. *J Urol* 2000;163:119-126.

81. Horninger W, Cheli CD, Babaian RJ, Fritsche HA, Lepor H, Taneja SS, et al. Complexed prostate-specific antigen for early of prostate cancer in men with serum prostate -specific levels of 2 to 4 nanograms per milliliter. *Urology* 2002;60:31-35.

82. España F, Royo M, Martínez M, Enguidanos MJ, Vera CD, Estellés A, et al. Free and complexed prostate specific antigen in the differentiation of benign hyperplasia and prostate cancer: studies in serum and plasma samples. *J Urol* 1998;160(6):2081-2088.
83. Nguyen M. Angiogenic factors as tumor markers. *Investigational New Drugs* 1997;15:29-37.
84. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267(6):10931-10934.
85. Wellstein A. Why monitor angiogenic factors in patients' urine?. *J Natl Cancer Inst* 1994;86(5):328-329.
86. Lee R, Droller MJ. The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. *Urol Clin North Am* 2000;1:1-13.
87. Folkman J, Long DM, Becker FF. Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer* 1963;16:453-458.
88. Folkman J, Cole P, Zimmerman S. Tumour behaviour in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Ann Surg* 1966;164(3):491-502.
89. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Eng J Med* 1971;285(21):1182-1186.
90. Gimbrone MA Jr, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor growth and neovascularization: An experimental model using rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 1974;52(2):413-427.
91. Gimbrone MA Jr, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 1972;136(2):261-276.

92. Brem S, Brem H, Folkman J, Finkelstein D, Patz A. Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous. *Cancer Res* 1976;36(8):2807-2812.
93. Folkman J. Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res* 1974;34(8):2109-2113.
94. Knighton D, Ausprunk D, Tapper D, Folkman J. Avascular and vascular phases of tumor growth in the chick embryo. *Br J Cancer* 1977;35(3):347-356.
95. Thompson WD, Shiack KJ, Fraser RA, Mc Intosh LC, Simpson JG. Tumors acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel ingrowth. *J Pathol* 1987;151(4):323-332.
96. Skinner SA, Tutton PJ, O'Brien PE. Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat. *Cancer Res* 1990;50(8):2411-2417.
97. Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, et al. Synthetic analogues of fumagilin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 1990;348(6301):555-557.
98. Folkman J. Tumor angiogenesis. En: Liotta LA, editor. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1995. p. 206-232.
99. Gross JL, Herblin WF, Dusak BA, Czerniak P, Diamond MD, Sun T, et al. Effects of modulation of basic fibroblast growth factor on tumor growth in vivo. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(2):121-131.
100. Hori A, Sasada R, Matsutani E, Naito K, Sakura Y, Fujita T, et al. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human. *Cancer Res* 1991;51(22):6180-6184.

101. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Philips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993;362(6423):841-844.
102. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1985;43:175-203.
103. Neal DE. Cancer, tumour suppressor genes and oncogenes. En: George NJR, editor. *The scientific basis of urology*. Londres: Isis Medical Media; 1999. p. 301-317.
104. Scardino PT, Weaver R, Hudson MA. Early detection of prostate cancer. *Human Pathol* 1992;23:211-222.
105. Shi XB, Gumerlock PH, deVere White RW. Molecular biology of prostate cancer. *World J Urol* 1996;14:318-328.
106. Nupponen N, Visakorpi T. Molecular biology of progression of prostate cancer. *Eur Urol* 1999;35:351-354.
107. Dong JT, Isaacs WB, Isaacs JT. Molecular advances in prostate cancer. *Curr Opin Oncol* 1997;9:101-107.
108. MacGrogan D, Bookstein R. Tumor suppressor genes in prostate cancer. *Semin Cancer Biol* 1997;8:11-19.
109. Ali IU, Schriml LM, Dean M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1922-1932.
110. Ali IU, Senger DR, Smith LEH. Angiogenesis as a potential biomarker in prostate cancer chemoprevention trials. *Urology* 2001;57(Supl 4A):143-147.

111. Fudge K, Bostwick DG, Stearns M. Platelet derived growth factor A and B chains and the alpha and beta receptors in prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 1996;29:282-286.
112. Morote J, de Torres I, Caceres C, Vallejo C, Schwartz S Jr, Reventos J. Prognostic value of immunohistochemical expression of the c-erbB2 oncoprotein in metastatic prostate cancer. *Int J Cancer* 1999;84(4):421-425.
113. Peehl DM. Oncogenes in prostate cancer. *Cancer* 1993;71:1159-1164.
114. Wang YZ, Wong YC. Oncogenes and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Urol Oncol* 1997;3:41-46.
115. Rennie PS, Nelson CC. Epigenetic mechanism for progression of prostatic cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;17:401-409.
116. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86(3):353-364.
117. Sakr WA, Grignon DJ. Prostate cancer: indicators of aggressiveness. *Eur Urol* 1997;3:15-23.
118. Campbell SC. Advances in angiogenesis research: relevance to urological oncology. *J Urol* 1997;158:1663-1674.
119. Moul JW. Angiogenesis, p53, bcl-2 and Ki-67 in the progression of prostate cancer after radical prostatectomy. *Eur Urol* 1999;35:399-407.
120. Brawer MK. Quantitative microvessel density. A staging and prognostic marker for human prostatic carcinoma. *Cancer* 1996;78:345-349.

121. Offerson BV, Borre M, Overgaard J. Immunohistochemical determination of tumor angiogenesis measured by the maximal microvessel density in human prostate cancer. *APMIS* 1998;106:463-469.

122. Bostwick DG, Iczkowski KA. Microvessel density in prostate cancer: prognostic and therapeutic utility. *Semin Urol Oncol* 1998;16:118-123.

123. Joseph IB, Isaacs JT. The antiangiogenic agent linomide inhibits tumor necrosis factor-alpha secretion via inhibition of its synthesis. *Prostate* 1996;29:183-190.

124. Joseph IB, Vukanovic J, Isaacs JT. Antiangiogenic treatment with linomide as chemoprevention for prostate, seminal vesicle, and breast carcinogenesis in rodents. *Cancer Res* 1996;56:3404-3408.

125. Joseph IB, Isaacs JT. Potentiation of the angiogenic ability of linomide by androgen ablation involves downregulation of vascular endothelial growth factor in human androgen-responsive prostatic cancers. *Cancer Res* 1997;57:1054-1057.

126. Rusell PJ, Bennett S, Stricker P. Growth factor involvement in progression of prostate cancer. *Clin Chem* 1998;44:705-723.

127. Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI, Kurtzman SH, Albertsen PC, Laudone VP, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human prostate cancer: in situ and in vivo expression of VEGF by human prostate cancer cells. *J Urol* 1997;157(6):2329-2333.

128. Marme D. Tumor angiogenesis: the pivotal role of vascular endothelial growth factor. *World J Urol* 1996;14:166-174.

129. Claffey KP, Robinson GS. Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1996;15(2):165-176.
130. Mundy AR. An introduction to cell biology. En: George NJR, editor. *The scientific basis of urology*. Londres: Isis Medical Media; 1999. p. 1-28.
131. Dulinska J, Laidler P, Labedz M. Comparative analysis of prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen mRNA levels in hyperplastic prostate stimulated with steroid hormones and growth factors. *Acta Biochim Polon* 2002;49(2):357-368.
132. Cohen P, Grawes H, Peehl D, Kamarei M, Giudice L, Rosenfeld R. Prostate-specific antigen (PSA) is an insuline-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1046-1053.
133. Cohen P, Peehl D, Lamson G, Rosenfeld R. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins in primary cultures of prostate epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73(2):401-407.
134. Iwamura M, Sluss P, Casamento J, Cockett A. Insuline-like growth factor-I. Action and receptor characterization in human prostate cancer cell lines. *Prostate* 1993;22:243-252.
135. Cohen P. Serum insuline-like growth factor-I levels and prostate cancer risk- interpreting the evidence. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:876-879.
136. Kim H-G, Kassis J, Souto J, Turner T, Wells A. EGF receptor signaling in prostate morphogenesis and tumorigenesis. *Histol Histopathol* 1999;14:1175-1182.
137. Jarrad D, Blitz B, Smith R, Patai B, Rukstalis D. Effects of epidermal growth factor on prostate cancer line PC3 growth and invasion. *Prostate* 1994;24:46-53.

138. Fong CJ, Sherwood ER, Mendelsohn J, Lee C, Kozlowski JM. Epidermal growth factor receptor monoclonal antibody inhibits constitutive receptor phosphorylation, reduces autonomous growth, and sensitizes androgen-independent prostatic carcinoma cells to tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res* 1992;52:5887-5892.
139. Harper M, Goddard L, Glynne-Jones E. An immunochemical analysis of TGF-alpha expression in benign and malignant prostate. *Prostate* 1993;23:9-23.
140. Cohen D, Simak R, Fair W, Melamed J, Scher H, Cordon-Cardo C. Expression of transforming growth factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in human prostate tissues. *J Urol* 1994;152:2120-2124.
141. Connolly J, Rose D. Production of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha by the androgen-responsive LNCaP human prostate cancer cell line. *Prostate* 1990;16:209-218.
142. Nishi N, Oya H, Matsumoto K, Nakamura T, Miyataka H, Wada F. Changes in gene expression of growth factors and their receptors during castration-induced involution and androgen-induced regrowth of rat prostates. *Prostate* 1996;28:139-152.
143. Perry K, Anthony C, Steiner M. Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in normal and malignant human prostate. *Prostate* 1997;33:133-140.
144. Story M, Hopp K, Meier D. Regulation of basic fibroblast growth factor expression by transforming growth factor beta in cultured human prostate stroma cells. *Prostate* 1996;28:219-226.
145. Barrack E. TGF beta on prostate cancer: a growth inhibitor that can enhance tumorigenicity. *Prostate* 1997;31:61-70.

146. Kim I, Ahn H, Zeiner D, Shaw J, Lang S, Kato M. Loss of expression of transforming growth factor beta type I and type II receptors correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues. *Clin Cancer Res* 1996;2:1255-1261.
147. Story M, Livingston B, Baeten L. Cultured human prostate-derived fibroblast produce a factor that stimulates their growth with properties indistinguishable from basic fibroblast growth factor. *Prostate* 1989;15:355-365.
148. Cronauer MV, Hittmair A, Eder IE, Hobisch A, Culig Z, Ramoner R, et al. Basic fibroblast growth factor levels in cancer cell and in sera of patients suffering from proliferative disorders of the prostate. *Prostate* 1997;31(4):223-233.
149. Yan G, Fukabori Y, McBride G, Nikolaropoulos S, McKeegan W. Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF) - FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol Cell Biol* 1993;13:4513-4522.
150. Yan G, Fukabori Y, Nikolaropoulos S, Wang F, McKeegan W. Heparin-binding keratinocyte growth factor is a candidate stromal to epithelial cell andromedin. *Mol Endocrinol* 1992;6:2123-2128.
151. Lu W, Luo Y, Kan MK, McKeegan W. Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J Biol Chem* 1999;274:12827-12834.
152. Leung H, Metha P, Gray I, Collins A, Robson C, Neal DE. Keratinocyte growth factor expression in hormone insensitive prostate cancer. *Oncogene* 1997;15:1115-1120.
153. Fudge K, Wang C, Stearns M. Immunohistochemistry analysis of platelet derived growth factor A and B chains and platelet derived growth factor alpha and

beta receptor expression in benign prostatic hyperplasias and Gleason-graded human prostate adenocarcinomas. *Mod Pathol* 1994;7:549-554.

154. Jackson M, Bentel J, Tilley W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1997;157:2323-2338.

155. Campbell SC, Savarese D, Quesenberry P, Savarese T. Expression of multiple angiogenic cytokines in cultured normal human prostate epithelial cells: predominance of vascular endothelial growth factor. *Int J Cancer* 1999;80:868-874.

156. Melnyk O, Zimmerman M, Kim KJ, Schuman M. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody inhibits further growth of established prostate cancer and metastases in a pre-clinical model. *J Urol* 1999;161:960-963.

157. Chan J, Stampfer M, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, et al. Plasma insuline-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 1998;279(5350):563-566.

158. Fowler JE Jr, Lau JL, Ghosh L, Mills SE, Mounzer A. Epidermal growth factor and prostatic carcinoma: an immunohistochemical study. *J Urol* 1988;139(4):857-861.

159. Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Hittmair A, Zhang J, et al. Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors. *Prostate* 1996;28(6):392-405.

160. Byrne RL, Leung H, Neal DE. Peptide growth factors in the prostate as mediators of stromal epithelial interaction. *Br J Urol* 1996;77:627-633.

161. Giri D, Ittman M. Interleukin-1a is a paracrine inducer of FGF7, a key epithelial growth factor in benign prostatic hyperplasia. *Am J Pathol* 2000;157:249-255.
162. Eisenberger MA, Reyno LM, Jodrell DI, Sinibaldi VJ, Tkaczuk KH, Sridhara R, et al. Suramin, an active drug for prostate cancer; interim observations in a phase I trial. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(8):611-621.
163. Calvo E, Cortés J, Rodríguez J, Sureda M, Beltrán C, Rebollo J, et al. Fixed higher dose schedule of suramin plus hydrocortisone in patients with hormone refractory prostate carcinoma a multicenter Phase II study. *Cancer* 2001;92(9):2435-2443.
164. Gordon MS, Margolin K, Talpaz M, Sledge GW Jr, Holmgren E, Benjamin R, et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2001;19(3):843-850.
165. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985.
166. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cell growth and angiogenesis. *Biochim Biophys Res Commun* 1989;161(2):851-858.
167. Ploüet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by A₁T₂₀ cells. *EMBO J* 1989;8:3801-3807.

168. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to platelet derived growth factor. *Science* 1989;246:1309-1312.

169. Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-1309.

170. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-676.

171. Chevalier S, Defoy I, Lacoste J, Guy L, Bégin LR, Aprikian AG. Vascular endothelial growth factor and signaling in the prostate: more than angiogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2002;189:169-179.

172. Zachary I. Vascular endothelial growth factor. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1169-1174.

173. Stewart RJ, Panigrahy D, Flynn E, Folkman J. Vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis are regulated by androgens in hormone responsive human prostate carcinoma: evidence for androgen dependent destabilization of vascular endothelial growth factor transcripts. *J Urol* 2001;165:688-693.

174. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996;271(2):603-606.

175. Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, et al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 1993;12(3-4):303-324.

176. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, et al. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 1993;143:1255-1262.
177. Mattern J, Koomagi R, Voom M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumor cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer* 1996;73:931-934.
178. Hashimoto M, Oshawa M, Ohnishi A, Naka N, Hirota S, Kitamura Y, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNA in angiosarcoma. *Lab Invest* 1995;73(6):859-863.
179. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in vivo. *Nature* 1992;359:845-847.
180. Philips HS, Armanini M, Stavrou D, Ferrara N, Westphal M. Intense focal expression of vascular endothelial growth factor mRNA in human intracranial neoplasms: association with regions of necrosis. *Int J Oncol* 1993;2:913-919.
181. Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, et al. Expression of the vascular permeability / vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J Clin Invest* 1993;91(1):153-159.
182. Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene* 1995;11(8):1569-1579.
183. Olson TA, Mohanraj D, Carso LF, Ramakrishan S. Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res* 1994;54:276-280.

184. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(16):1237-1245.

185. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Human Pathol* 1995;26(1):86-91.

186. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993;53(19):4727-4735.

187. Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, et al. Vascular permeability factor / endothelial growth factor (VPF / VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med* 1994;180(1):341-346.

188. Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992;176(5):1375-1379.

189. Brown LF, Berse B, Tognazzi K, Manseau EJ, Van De Water L, Senger DR, et al. Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney. *Kidney Int* 1992;42(6):1457-1461.

190. Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EH. Expression of vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol* 1993;264(4 Pt1):995-1002.

191. Ferrara N, Winer J, Burton T. Aortic smooth muscle cells express and secrete vascular endothelial growth factor. *Growth Factors* 1991;5(2):141-148.

192. Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest* 1993;91(5):2235-2243.
193. Connolly DT, Heuvelman D, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989;84(5):1470-1478.
194. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, Donner DB. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem* 1996;271(46):29483-28488.
195. Goldberg M, Schneider T. Similarities between the oxygen sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem* 1994;269(6):4355-4359.
196. Zachary I, Glikli G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001;49:568-581.
197. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999;77(7):527-543.
198. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by DGFB and VEGF. *Development* 1998;125:1591-1598.
199. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998;273:30336-30343.

200. Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, et al. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Res Commun* 1999;264:781-788.
201. Abedi H, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and axillin in endothelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:15442-15451.
202. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, et al. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994;79:1157-1164.
203. Ferrara N, Davis-Smith T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25.
204. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996;32A:2413-2422.
205. Pedram A, Razandi, M, Levin, ER. Extracellular signal-regulated protein kinase/Jun kinase cross-talk underlies vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 1998;273:26722-26728.
206. Wellner M, Maasch C, Kupprion C, Lindschau C, Luft FC, Haller H. The proliferative effect of vascular endothelial growth factor requires protein kinase C-alpha and protein kinase C-zeta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:178-185.
207. Glikli G, Abu-Ghazaleh R, Jezequel S, Wheeler-Jones C, Zachary I. Vascular endothelial growth factor-induced prostacyclin production is mediated by a protein kinase C (PKC)-dependent activation of extracellular signal-regulated protein

kinases 1 and 2 involving PKC-delta and by mobilization of intracellular Ca²⁺.
Biochem J 2001;353:503-512.

208. Noiri E, Hu Y, Bahou WF, Keese CR, Giaever I, Goligorsky MS. Permissive role of nitric oxide in endothelin-induced migration of endothelial cells. J Biol Chem 1997;272:1747-1752.

209. Rousseau S, Houle F, Kotanides H, Witte L, Waltenberger J, Landry J, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. J Biol Chem 2000;275:10661-10672.

210. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. Nature 1999;399:601-605.

211. He H, Venema VJ, Gu X, Venema RC, Marrero MB, Caldwell RB. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. J Biol Chem 1999;274:25130-25135.

212. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, et al. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. Nature 1998;392:821-824.

213. Shen BQ, Lee DY, Zioncheck TF. Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. J Biol Chem 1999;274:33057-33063.

214. Korpelainen EI, Karkkainen M, Gunji Y, Vikkula M, Alitalo K. Endothelial receptor tyrosine kinases activate the STAT signaling pathway: mutant Tie-2

causing venous malformations signals a distinct STAT activation response. *Oncogene* 1999;18:1-8.

215. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor type I in microvascular endothelial cells. *Biochim Biophys Res Commun* 1991;181:557-562.

216. Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, Ferrara N, Wasi S, Mazziere R, et al. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995;270(17):9709-9716.

217. Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 1998;97:99-107.

218. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gerstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380(6573):435-439.

219. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380(6573):439-442.

220. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999;126:1149-1159.

221. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, et al. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 1998;4:336-340.

222. Tonnesen M, Feng X, Clark R. Angiogenesis in wound healing. *J Investig dermatol Symp Proc* 2000;5:40-46.

223. Melnyk O, Shuman MA, Kim K J. Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth. *Cancer Res* 1996;56:921-924.

224. Borgstrom P, Bourdon M A, Hillan K J, Sriramarao P, Ferrara N. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo. *Prostate* 1998;35:1-10.

225. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002;20:4368-4380.

226. Aiello LP, Avery R, Arrigg R, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Eng J Med* 1994;331(22):1480-1487.

227. Brenner RM, Nayak NR, Slayden OD, Critchley HO, Kelly RW. Premenstrual and menstrual changes in the macaque and human endometrium: relevance to endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:60-74.

228. Wu HM, Huang Q, Yuan Y, Granger HJ. Wu,H.M., Huang,Q., Yuan,Y., and Granger,H.J. (1996). VEGF induces NO-dependent hyperpermeability in coronary venules. *Am J Physiol* 1996;271:2735-2739.

229. Bates DO, Curry FE. Vascular endothelial growth factor increases hydraulic conductivity of isolated perfused microvessels. *Am J Physiol* 1996;271:2520-2528.

230. Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat* 2002;200:581-597.
231. Feng D, Nagy JA, Hipp J, Dvorak HF, Dvorak AM. Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin. *J Exp Med* 1996;183:1981-1986.
232. Bates DO. The chronic effect of vascular endothelial growth factor on individually perfused frog mesenteric microvessels. *J Physiol* 1998;513(1):225-233.
233. Roberts WG, Palade G. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995;108:2369-2379.
234. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992;114:521-532.
235. Roberts WG, Palade GE. Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res* 1997;57:765-772.
236. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 1998;140:974-959.
237. Cohen AW, Carbajal JM, Schaeffer RC Jr. VEGF stimulates tyrosine phosphorylation of beta-catenin and small-pore endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol* 1999;277:2038-2049.

238. Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, Wolpert EB, Gardner TW. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem* 1999;274:23463-23467.
239. Dvorak HF. Tumours: wounds that do not heal. *N Eng J Med* 1986;315:1650-1658.
240. Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheres DA. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 1999;4:915-924.
241. Eriksson A, Cao R, Roy J, Tritsarlis K, Wahlestedt C, Dissing S, et al. Small GTP-binding protein Rac is an essential mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial fenestrations and vascular permeability. *Circulation* 2003;107:1532-1538.
242. Breslin JW, Pappas PJ, Cerveira JJ, Hobson RW, Duran WN. VEGF increases endothelial permeability by separate signaling pathways involving ERK-1/2 and nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ* 2003;284:92-100.
243. Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation of coronary arteries. *Am J Physiol* 1993;265(2 Pt 2):586-592.
244. Brock TA, Dvorak HF, Senger DR. Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca²⁺ and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol* 1991;138:213-221.
245. Hariawala MD, Horowitz JR, Esakof D, Sheriff DD, Walter DH, Keyt B, et al. VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J Surg Res* 1996;63:77-82.

246. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, et al. Effects of VEGF on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27(6):838-844.
247. Malavaud B, Tack I, Jonca F, Praddaude F, Moro F, Ader JL, et al. Activation of Flk-1/KDR mediates angiogenesis but not hypotension. *Cardiovasc Res* 1997;36:276-281.
248. Li B, Ogasawara AK, Yang R, Wei W, He GW, Zioncheck TF, et al. KDR (VEGF receptor 2) is the major mediator for the hypotensive effect of VEGF. *Hypertension* 2002;39:1095-1100.
249. Brown LF, Detmar M, Tognazzi K, Abu-Jawdeh G, Iruela-Arispe ML. Uterine smooth muscle cells express functional receptors (flt-1 and KDR) for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 1997;76:245-255.
250. Guerrin M, Moukadiri H, Chollet P, Moro F, Dutt K, Malecaze F, et al. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. *J Cell Physiol* 1995;164:385-394.
251. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci* 1999;19:5731-5740.
252. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, et al. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 2003;299:890-893.

253. Cucina A, Borrelli V, Randone B, Coluccia P, Sapienza P, Cavallaro A. Vascular endothelial growth factor increases the migration and proliferation of smooth muscle cells through the mediation of growth factors released by endothelial cells. *J Surg Res* 2003;109:16-23.
254. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996;87:3336-3343.
255. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002;196:1497-1506.
256. Rabbany SY, Heissig B, Hattori K, Rafii S. Molecular pathways regulating mobilization of marrow-derived stem cells for tissue revascularization. *Trends Mol Med* 2003;9:109-117.
257. Vincenti V, Casano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to the human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93:1493-1495.
258. Tischer E, Mitchell R, Hartmann T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266(18):11947-11954.
259. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806-1814.

260. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992;267:26031-26037.
261. Park JE, Keller G-A, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms. Differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of ECM-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993;4:1317-1326.
262. Rifkin DB, Moscatelli D, Bizik J, Quarto N, Blei F, Dennis P, et al. Growth factor control of extracellular proteolysis. *Cell Differ Devel* 1990;32(3):313-318.
263. Keyt B, Berleau L, Nguyen H, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, et al. The carboxi terminal domain (111-165) of VEGF is critical for mitogenic potency. *J Biol Chem* 1996;271(13):7788-7795.
264. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Structure and Function* 2001;26:25-35.
265. Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 1998;273:6417-6423.
266. Ozawa K, Kondo T, Hori O, Kitao Y, Stern DM, Eisenmenger W, et al. Expression of the oxygen-regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport. *J Clin Invest* 2001;108:41-50.
267. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12:5447-5454.

268. Sutter CH, Laughner E, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4748-4753.

269. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxiainducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002;16:1151-1162.

270. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 1998;7:205-213.

271. Chun YS, Choi E, Kim TY, Kim MS, Park JW. A dominant-negative isoform lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia-inducible factor-1alpha gene. *Biochem. Biochem J* 2002;362:71-79.

272. Claffey KP, Wilkison WO, Spiegelman BM. Claffey, K.P., Wilkison, W.O., and Spiegelman, B.M. (1992). Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J Biol Chem* 1992;267:16317-16322.

273. Zhang L, Yu D, Hu M, Xiong S, Lang A, Ellis LM, et al. Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* 2000;60:3655-3661.

274. Pujasola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, et al. Flt-4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cells. *Cancer Res* 1992;52(20):5738-5743.

275. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997;276:1423-1425.

276. Terman BI, Vermazen MD, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochim Biophys Res Commun* 1992;187(3):1579-1586.

277. de Vries, Escobedo JA, Ueno H, Houck KA, Ferrara N, Williams LT. The fms tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-991.

278. Quinn T, Peters KG, de Vries, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7533-7537.

279. Keyt B, Nguyen H, Berleau L, Duarte C, Park JE, Chen H, et al. Identification of VEGF determinants for binding Flt-1 and KDR receptors. Generation of receptor selective VEGF variants by site directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1996;271:5638-5646.

280. Davis-Smith T, Chen H, Park JE, Ferrara N. The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initial a signal transduction cascade. *EMBO J* 1996;15:4919-4927.

281. Kendell RI, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial growth factor by an endogenously encode soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10705-10709.

282. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.

283. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376:62-66.

284. Gille H, Kowalski J, Yu L, Chen H, Pisabarro MT, Davis-Smyth T, et al. A repressor sequence in the juxtamembrane domain of Flt-1 (VEGFR-1) constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3'-kinase activation and endothelial cell migration. *EMBO J* 2000;19:4064-4073.

285. Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yakazi Y, Shibuya M. A novel type of vascular endothelial growth factor: VEGF-E (NZ-7 VEGF) preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin binding domain. *J Biol Chem* 1998;273:31273-31282.

286. Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, Herzog Y. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2002;12:13-19.

287. Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y, Yamamoto M, Ohkawa K, Ito Y, et al. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1996;56(13):3004-3009.

288. Duque JLF, Loughlin KR, Adam RM, Kantoff PW, Zurakowski D, Freeman MR. Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 1999;54(3):523-527.

289. Viac J, Schmitt D, Claudy A. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) is not a prognostic indicator in malignant melanoma. *Cancer Lett* 1998;125:35-38.

290. Kumar H, Heer K, Lee PW, Duthie GS, MacDonald AW, Greenman J, et al. Preoperative serum vascular endothelial growth factor can predict stage in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4(5):1279-1285.
291. Salven P, Maenpaa H, Orpana A. Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:647-651.
292. Toi M, Hoshina S, Takayanagi T, Tominaga T. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1994;85(10):1045-1049.
293. Gospodarowicz D. Fibroblast growth factor. Chemical structure and biologic function. *Clin Orthop Relat Res* 1990;257:231-248.
294. Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Ithoh N. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta* 2000;1492:203-206.
295. Nakatake Y, Hoshikawa M, Asaki T, Kassai Y, Ithoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-22, preferentially expressed in the inner root sheath of the hair follicle. *Biochim Biophys Acta* 2001;1517:460-463.
296. Yamashita T, Yoshioka M, Ithoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochim Biophys Res Commun* 2000;277:494-498.
297. Cronauer MV, Schulz WA, Seifert HH, Ackermann R, Burchardt M. Fibroblast growth factors and their receptors in urological cancers: basic research and clinical implications. *Eur Urol* 2003;43:309-319.
298. Thompson AA. Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. *Reproduction* 2001;121:187-195.

299. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 2000;7(3):165-167.
300. Martin GR. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes and Development* 1998;12:1571-1586.
301. Barritault D. Increased immunodetection of acidic fibroblast growth factor in bladder cancer, detectable in urine. *J Urol* 1993;150:1126-1130.
302. Ravery V, Jouanneau J, Gil Diez S, Abbou CC, Caruelle JP, Barritault D, et al. Immunohistochemical detection of acidic fibroblast growth factor in bladder transitional cell carcinoma. *Urol Res* 1992;20:211-214.
303. Ropiquet F, Giri D, Kwabi-Addo B, Mansukhani A, Ittman M. Increased expression of fibroblast growth factor 6 in human prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Cancer Res* 2000;60:4245-4250.
304. Leung HY, Dickson C, Robson CN, Neal DE. Overexpression of fibroblast growth factor-8 in human prostate cancer. *Oncogene* 1996;12:1833-1835.
305. Singh RK, Bucana CD, Gutman M, Fan D, Wilson MR, Fidler IJ. Organ site-dependent expression of basic fibroblast growth factor in human renal cell carcinoma cells. *Am J Pathol* 1994;145:365-374.
306. Suzuki K, Tokue A, Kamiakito T, Kuriki K, Tanaka A. Predominant expression of fibroblast growth factor (FGF) 8, FGF4, and FGF receptor 1 in nonseminomatous and highly proliferative components of testicular germ cell tumors. *Virchows Arch* 2001;439:616-621.
307. Granerus M, Welin A, Lundh B, Schofield PN, Ekstrom TJ, Engstrom W. Heparin binding growth factors and the control of teratoma cell proliferation. *Eur Urol* 1993;23:76-81.

308. Baird A, Böhlen P. Fibroblast growth factors. En: Roberts AB, editor. Peptide growth factors and their receptors. I. Nueva York: Springer; 1991. p. 368-418.
309. Gospodarowicz D, Cheng J. Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J Cell Physiol* 1986;128:475-484.
310. Damon DH, Lobb RR, D'Amore PA, Wagner JA. Heparin potentiates the action of acidic fibroblast growth factor by prolonging its biological half life. *J Cell Physiol* 1989;138:221-226.
311. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 1996;271:15292-15297.
312. Givol D, Yayon A. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J* 1992;6:3362-3369.
313. Jaye M, Schlessinger J, Dionne CA. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1992;1135:185-199.
314. Sano H, Forough R, Maier JAM, Case JP, Jackson A, Engleka K, et al. Detection of high levels of heparin binding growth factor-1 (acidic fibroblast growth factor) in inflammatory arthritic joints. *J Cell Biol* 1990;110:1417-1426.
315. Ichimura T, Maier JAM, Maciag T, Zhang G, Stevens JL. FGF-1 in normal and regenerating kidney: expression in mononuclear, interstitial, and regenerating epithelial cells. *Am J Physiol* 1995;269:653-662.
316. Gabbianelli M, Sargiacomo M, Pelosi E, Testa U, Isacchi G, Peschle C. "Pure" human hematopoietic progenitors permissive action of basic fibroblast growth factor. *Science* 1990;249:1561-1564.

317. Klasbrun M, Folkman J. Angiogenesis. En: Roberts AB, editor. Peptide growth factors and their receptors. II. Nueva York: Springer; 1991. p. 549-586.
318. Lazarous DF. The fibroblast growth factors and angiogenesis: basic considerations. *Curr Interv Cardiol Rep* 2001;3(3):213-217.
319. Miyake H, Yoshimura K, Hara I, Eto H, Arakawa S, Kamidono S. Basic fibroblast growth factor regulates matrix metalloproteinases production and in vitro invasiveness in human bladder cancer cell lines. *J Urol* 1997;157:2351-2355.
320. Duensing S, Grosse J, Atzpodien J. Increased serum levels of basic fibroblast growth factor (bFGF) are associated with progressive lung metastases in advanced renal cell carcinoma patients. *Anticancer Res* 1995;15:2331-2333.
321. Ruohola JK, Viitanen TP, Valve EM, Seppanen JA, Loponen NT, JJ K, et al. Enhanced invasion and tumor growth of fibroblast growth factor 8b-overexpressing MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:4229-4237.
322. Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Berger HG UE, Onada M, Yamashita T. Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res* 1993;53:5297-5299.
323. Ornitz DM. FGFs, heparansulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* 2000;22:108-112.
324. Tassi E, Al-Attar A, Aigner A, Swift MR, McDonnell K, Karavanov A, et al. Enhancement of fibroblast growth factor (FGF) activity by an FGF-binding protein. *J Biol Chem* 2001;276(43):40247-40253.
325. Wu DQ, Kan MK, Sato GH, Okamoto T, Sato JD. Characterization and molecular cloning of a putative binding protein for heparin-binding growth factors. *J Biol Chem* 1991;266(25):16778-16785.

326. Gospodarowicz D. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J Biol Chem* 1975;250:2515-2519.
327. Di Mario J, Buffinger N, Yamada S, Strohman RC. Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. *Science* 1989;244:688-690.
328. Dow JK, DeVere White RW. Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. *Urology* 2000;55(6):800-806.
329. Mergia A, Eddy R, Abraham JA, Fiddes JC, Shows TB. The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes. *Biochim Biophys Res Commun* 1986;138(2):644-651.
330. Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Friedmann J, Gospodarowicz D, et al. Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J* 1986;5(10):2523-2528.
331. Gospodarowicz D. Fibroblast growth factor and its involvement in developmental processes. *Curr Top Dev Biol* 1990;24:57-93.
332. Bugler B, Amalric F, Prats H. Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblastic growth factor. *Mol Cell Biol* 1991;11:573-577.
333. Amalric F, Bouche G, Bonnet H, Brethenou P, Roman AM, Truchet I, et al. Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in the nucleus: translocation process and targets. *Biochim Pharmacol* 1994;47:111-115.
334. McNeil PL, Muthukrishnan L, Warder E, D'Amore PA. Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *J Cell Biol* 1989;109:811-822.

335. Vlodawsky I. Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism? *Trends Biochem Sci* 1991;16:268-271.
336. Costa M, Danesi R, Agen C, Di Paolo A, Basolo F, Del Bianchi S, et al. MCF10A cells infected with int-2 oncogene induce angiogenesis in chick chorioallantoic membrane and rat mesentery. *Cancer Res* 1994;54:9-11.
337. Schneeberger SA, Hjelmeland LM, Tucker RP, Morse LS. Vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor 5 are co-localized in vascular and avascular epiretinal membranes. *Am J Ophthalmol* 1997;124:447-454.
338. Gillis P, Salva U, Volpert OV, Jimenez B, Waters CM, Panos RJ, et al. Keratinocyte growth factor induces angiogenesis and protects endothelial barrier function. *J Cell Sci* 1999;112:2049-2057.
339. Yoshida T, Ishimaru K, Sakamoto H, Yokota J, Hirohashi S, Igarashi K, et al. Angiogenic activity of the recombinant hst-1 protein. *Cancer Lett* 1994;83(1-2):261-268.
340. Bok RA, Halabi S, Fei DT, Rodriguez CR, Hayes DF, Vogelzang NJ, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor urine levels as predictors of outcome in hormone-refractory prostate cancer patients: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res* 2001;61:2533-2536.
341. Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, Teramoto, Thomas SS, Waeber C, et al. FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5874-5879.
342. Cohn MJ, Izpisua-Belmonte JC, Abud H, Heath JK, Tickle C. Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* 1995;80:739-746.

343. Crossley PH, Minowada C, MacArthur CA, Martin GR. Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* 1996;84:127-136.

344. Thompson AA, Cunha GR. Prostatic growth and development are regulated by FGF10. *Development* 1999;126:3693-3701.

345. Ichimura T, Finch PW, Zhang G, Kan MK, Stevens JL. Induction of FGF-7 after kidney damage: a possible paracrine mechanism for tubule repair. *Am J Physiol* 1996;271:967-976.

346. Ay I, Sugimori H, Finkelstein SP. Intravenous basic fibroblast growth factor (bFGF) decreases DNA fragmentation and prevents down-regulation of Bcl-2 in the ischemic brain following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Mol* 2001;87:71-80.

347. Kondo S, Yin D, Aoki T, Takashashi JA, Morimura T, Takeuchi J. bcl-2 gene prevents apoptosis of basic fibroblast growth factor-deprived murine aortic endothelial cells. *Exp Cell Res* 1994;213:428-432.

348. Shaulian E, Resnitzky D, Shifman O, Blandino G, Amysterdan A, Yayon A, et al. Induction Mdm2 and enhancement of cell survival by bFGF. *Oncogene* 1997;15:2717-2725.

349. Culig Z, Cronauer MV, Hobisch A, Bartsch G, Klocher H. Fibroblast growth factors and their receptors in metastases of prostate and other urological cancers. En: Nakamura T, editor. *Growth factors and their receptors in cancer metastases*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2001. p. 93-106.

350. Roscioli T, Flanagan S, Kumar P, Masel J, Gattas M, Hyland VJ, et al. Clinical findings in a patient with FGFR1 P252R mutation and comparison with the literature. *Am J Med Genet* 2000;93:22-28.

351. Gorry MC, Preston RA, White GJ, Zhang Y, Shinghal VK, Losken HW, et al. Crouzon syndrome: mutations in two spliceoforms of FGFR2 and a common point mutation shared with Jackson-Weiss syndrome. *Human Molec Genet* 1995;4:1387-1390.
352. Muenke M, Schell U, Hehr A, Robin N, Losken HW, Schinzel A, et al. A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nature Genet* 1994;8(3):269-274.
353. Elkin M, Ilan N, Ishai-Michaeli R, Friedmann Y, Papo O, Pecker I, et al. Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action. *FASEB J* 2001;15:1661-1663.
354. Aigner A, Butscheid M, Kunkel P, Krause E, Lamszus K, Wellstein A, et al. An FGF-binding protein (FGF-BP) exerts its biological function by parallel paracrine stimulation of tumor cell and endothelial cell proliferation through FGF-2 release. *Int J Cancer* 2001;92:510-517.
355. Aigner A, Renneberg H, Bojunga J, Apel J, Nelson PS, Czubyko F. Ribozyme-targeting of a secreted FGF-binding protein (FGF-BP) inhibits proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Oncogene* 2002;21:5733-5742.
356. Czubyko F, Smith RV, Chung HC, Wellstein A. Tumor growth and angiogenesis induced by a secreted protein for fibroblast growth factors. *J Biol Chem* 1994;269:28243-28248.
357. Sauter ER, Nesbit M, Tichansky D, Liu Z-J, Shirakawa T, Palazzo J, et al. Fibroblast growth factor-binding protein expression changes with disease progression in clinical and experimental squamous epithelium. *Int J Cancer* 2001;92:374-381.

358. Liu X-H, Aigner A, Wellstein A, Ray PE. Up-regulation of a fibroblast growth factor-binding protein in children with renal diseases. *Kidney Int* 2001;59:1717-1728.

359. Isaacs JT, Coffey DS. Androgenic control of prostatic growth: regulation of steroid levels. *UICC Monogr (Prostatic Cancer)* 1979;48:112-122.

360. Cronauer MV, Eder IE, Hittmair A, Sierek G, Hobisch A, Culig Z, et al. A reliable system for the culture of human prostatic cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997;33:742-744.

361. Thompson AA, Foster BA, Cunha GR. Analysis of growth factor and receptor mRNA levels during development of the rat seminal vesicle and prostate. *Development* 1997;124:2431-2439.

362. Dorkin TJ, Robinson MC, Marsh C, Bjartell A, Neal DE, Leung HY. FGF8 overexpression in prostate cancer is associated with decreased patient survival and persists in androgen independent disease. *Oncogene* 1999;18:2755-2761.

363. Dorkin TJ, Robinson MC, Marsh C, Neal DE, Leung HY. aFGF immunoreactivity in prostate cancer and its co-localization with bFGF and FGF8. *J Pathol* 1999;189:564-569.

364. Lu W, Luo Y, Kan MK, McKeehan W. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J Biol Chem* 1999;274:12827-12834.

365. Metha PB, Robson CN, Neal DE, Leung HY. Serum keratinocyte growth factor measurement in patients with prostate cancer. *J Urol* 2000;164:2151-2155.

366. Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, et al. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth

factor I, keratinocyte growth factor and epidermal growth factor. *Cancer Res* 1994;54:5474-5478.

367. Planz B, Wang Q, Kirley SD, Marberger M, McDougal WS. Regulation of keratinocyte growth factor receptor and androgen receptor in epithelial cells of the human prostate. *J Urol* 2001;166:678-683.

368. Cronauer MV, Stadlmann S, Klocher H, Abendstein B, Eder IE, Rogastch H, et al. Basic fibroblast growth factor synthesis by human peritoneal mesothelial cells: induction by interleukin 1 β . *Am J Pathol* 1999;155:1977-1984.

369. Giri D, Ittman M. Interleukin-8 is a paracrine inducer of fibroblast growth factor 2: a stromal and epithelial growth factor in benign prostatic hyperplasia. *Am J Pathol* 2001;159:139-147.

370. Guenette RS, Tenniswood M. The role of growth factors in the suppression of active cell death in the prostate: an hypothesis. *Biochem Cell Biol* 1994;72:553-559.

371. Saez C, Gonzalez Baena AC, Japon MA, Giraldez J, Segura DI, Rodriguez Vallejo JM, et al. Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors FGFR1 and FGFR2 in human benign prostatic hyperplasia treated with finasteride. *Prostate* 1999;40:83-88.

372. Sherwood ER, Fong CJ, Lee C, Kozlowski JM. Basic fibroblast growth factor: a potential mediator of stromal growth in the human prostate. *Endocrinology* 1992;130:2955-2963.

373. McConnell JD, Wilson JD, George FW, Geller J, Pappas F, Stoner E. Finasteride, an inhibitor of 5 α -reductase, suppresses prostatic dihydrotestosterone in men with benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:505-508.

374. Blotnick S, Peoples GE, Freeman MR, Eberlein TJ, Klagsbrun M. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2890-2894.

375. Fujimoto K, Ichimori Y, Yamaguchi H, Arai K, Futami K, Ozono S, et al. Basic fibroblast growth factor as a candidate tumor marker for renal cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1995;86:182-186.

376. Chodak GW, Hospelhorn V, Judge SM, Matyforth R, Koeppen H, Sasse J. Increased levels of fibroblast growth factor-like activity in urine from patients with bladder or kidney cancer. *Cancer Res* 1988;48:2083-2088.

377. O'Brien TS, Smith K, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. Urinary basic fibroblast growth factor in patients with bladder cancer and benign prostatic hypertrophy. *Br J Urol* 1995;76:311-314.

378. Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Richie JP, Folkman J. Elevated levels of the angiogenic peptide basic fibroblastic growth factor in urine of bladder cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:241-242.

379. Gleave M, Hsieh JT, Gao CA, von Eschenbach AC, Chung LW. Acceleration of human prostate cancer growth in vivo by factors produced by prostate and bone fibroblasts. *Cancer Res* 1991;51:3753-3761.

380. Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Richie JP, Hayes DF, Folkman J. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J Natl Cancer Inst* 1994;86(5):356-361.

381. Meyer GE, Yu E, Siegal JA, Petteway JC, Blumenstein BA, Brawer MK. Serum basic fibroblast growth factor in men with and without prostate carcinoma. *Cancer* 1995;76(11):2304-2311.

382. Valve EM, Nevalainen MT, Nurmi MJ, Laato MK, Martikainen PM, Härkönen PL. Increased expression of FGF-8 isoforms and FGF-8 receptors in human premalignant prostatic intraepithelial neoplastic lesions and prostate cancer. *Lab Invest* 2001;81:815-826.

383. Tanaka A, Furuya A, Yamasaki M, Hanai N, Kuriki K, Kamiakito T, et al. High frequency of fibroblast growth factor (FGF) 8 expression in clinical prostate cancers and breast tissues, immunohistochemically demonstrated by a newly established neutralizing monoclonal antibody against FGF 8. *Cancer Res* 1998;58:2053-2056.

384. Giri D, Ropiquet F, Ittman M. FGF-9 is an autocrine and paracrine prostatic growth factor expressed by prostatic stromal cells. *J Cell Physiol* 1999;180:53-60.

385. Pajouh MS, Nagle RB, Breathnach R, Finch JS, Brawer MK, Bowden GT. Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991;117:144-150.

386. Klein RD, Maliner-Jongewaard MS, Udayakumar TS, Boyd JL, Nagle RB, Bowden GT. Promatrilysin expression is induced by fibroblast growth factors in the prostatic carcinoma cell line LNCaP but not in normal primary prostate epithelial cells. *Prostate* 1999;41:215-223.

387. Udayakumar TS, Klein RD, Maliner-Jongewaard MS, Nagle RB, Bowden GT. Aberrant expression of fibroblast growth factor receptor-1 in prostate epithelial cells allow induction of promatrilysin expression by fibroblast growth factors. *Int J Cancer* 2001;91:187-192.

388. Song SH, Wientjes MG, Gan Y, Au JLS. Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8658-8663.
389. Zhang G, Song S, Yang F, Au JL, Wientjes MG. Non-toxic doses of suramin enhance activity of doxorubicin in prostate tumors. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:426-433.
390. Yamazaki K, Nagao T, Yamaguchi H, Saisho H, Kondo Y. Expression of basic fibroblast growth factor (FGF-2) associated with tumor proliferation in human pancreatic carcinoma. *Virchows Arch* 1997;431:95-101.
391. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-674.
392. Choy M, Rafii S. Role of angiogenesis in the progression and treatment of prostate cancer. *Cancer Invest* 2001;19(2):181-191.
393. Borre M, Offersen BV, Nerstrom B, Overgaard J. Microvessel density predicts survival in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. *Br J Cancer* 1998;78(7):940-944.
394. Sugamoto T, Tanji N, Sato K, Fujita H, Nishio S, Sakanaka M, et al. The expression of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with neovascularization. *Anticancer Res* 2001;21(1A):77-88.
395. Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI, Kurtzman SH, Albertsen PC, Laudone VP, et al. Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. *Urology* 1998;51(1):161-167.
396. Kadmon D. Beyond prostate specific antigen-markers for prostate cancer for the 21st century. *J Urol* 2000;163(3):828.

397. Yamamoto Y, Toi M, Kondo S, Matsumoto T, Suzuki H, Kitamura M, et al. Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 1996;2(5):821-826.

398. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998;77(6):956-964.

399. Salven P, Orpana A, Heikki JH. Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 1999;5:487-491.

400. Salgado R, Vermeulen PB, Bogers, Dirix LY, Van Marck E. Platelets and endothelial growth factor (VEGF): a morphological and functional study. *Angiogenesis* 2001;4:37-44.

401. Verheul HMW, Hoekman K, Luykx-de Bakker S, Eekman CA, Folman CC, Broxterman HJ, et al. Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 1997;3(12):2187-2190.

402. Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tuder RM, Voelkel NF. In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol* 1998;275(3):1054-1061.

403. Dittadi R, Meo S, Fabris F, Gasparini G, Contri D, Medici M, et al. Validation of blood collection procedures for the determination of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) in different blood compartments. *Int J Biol Markers* 2001;16(2):87-96.

404. Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, Mac Lennan K, Allgar V, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of

plasma, serum and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res* 2000;60(11):2898-2905.

405. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. *Eur J Cancer* 2002;38:1564-1579.

406. Lee JK, Hong YJ, Han CJ, Hwang DY, Hong SI. Clinical usefulness of serum and plasma vascular endothelial growth factor in cancer patients: which is the optimal specimen? *Int J Oncol* 2000;17(1):149-152.

407. Kohli M, Kaushal V, Spencer HJ, Mehta P. Prospective study of circulating angiogenic markers in prostate-specific antigen (PSA)-stable and PSA-progressive hormone-sensitive advanced prostate cancer. *Urology* 2003;61(4):765-769.

408. George DJ, Regan MM, Oh WK, Tay MH, Manola J, DeCalo N, et al. Radical prostatectomy lowers plasma vascular endothelial growth factors levels in patients with prostate cancer. *Urology* 2004;63(2):327-332.

409. Jones A, Fujiyama C, Turner K, Fuggle S, Cranston D, Bicknell R, et al. Elevated serum vascular endothelial growth factor in patients with hormone-escaped prostate cancer. *BJU Int* 2000;85(3):276-280.

410. Trojan L, Thomas D, Knoll T, Grobholz R, Alken P, Michel MS. Expression of pro-angiogenic growth factors VEGF, EGF and bFGF and their topographical relation to neovascularisation in prostate cancer. *Urol Res* 2004;32(2):97-103.

411. Enjoji M, Nakamuta M, Yamaguchi K, Ohta S, Kotoh K, Fukushima M, et al. Clinical significance of serum levels of vascular endothelial growth factor and its receptor in biliary disease and carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11(8):1167-1171.