

UNIVERSIDAD DE OVIEDO



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Determinación plasmática de la metaloproteasa 9 en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata

TESIS DOCTORAL

Iván González Rodríguez

2011



UNIVERSIDAD DE OVIEDO



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Determinación plasmática de la metaloproteasa 9 en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata

TESIS DOCTORAL

Iván González Rodríguez

2011

Director:

Dr. Manuel Rivas del Fresno

Tutor:

Dra. Adonina Tardón García



AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Curso: 2010/2011

Datos personales:

Apellidos: GONZALEZ RODRIGUEZ
D.N.I. 53536790N

Nombre: IVAN

Datos Académicos:

Programa de Doctorado cursado: Investigación en cancer (Mención de Calidad)

Departamento responsable: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA

Departamento en el que presenta la tesis doctoral: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA

Título definitivo de la Tesis: Determinación plasmática de la metaloproteasa de matriz 9 en el diagnóstico y pronóstico del Cáncer de Próstata

Autorización del director/es de la tesis

D/D^a: TARDON GARCIA, ADONINA

Departamento: MEDICINA

D/D^a: RIVAS DEL FRESNO, MANUEL

Universidad: SESPA

FOR-OFE-VCE-021

Autoriza la presentación de la tesis doctoral en cumplimiento de lo establecido en el *Art. 35.1a de la "Modificación del Reglamento del tercer ciclo de estudios universitarios, la obtención y expedición del título de doctor y otros cursos de postgrado"*, aprobada por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 23 de octubre de 2008 (BOPA del 19 de diciembre de 2008).

Oviedo, 15 de marzo de 2011

Director de la Tesis

Director de la Tesis

Fdo: TARDON GARCIA, ADONINA

Fdo: RIVAS DEL FRESNO, MANUEL

ÍNDICE

1. Introducción

1.1. Epidemiología del Cáncer de próstata	07
1.2. Diagnóstico actual del Cáncer de Próstata: el PSA	08
1.3. Estadificación y pronóstico del Cáncer de Próstata	12
1.3.1. El estadio clínico.....	12
1.3.2. La biopsia de próstata.....	14
1.3.3. El PSA preoperatorio	15
1.3.4. Conclusiones del diagnóstico y estadificación pronóstica.....	15
1.4. Las metaloproteasas de matriz extracelular	16
4.1 Metaloproteasas y cáncer	18
1.5. Metaloproteasa de matriz 9.....	20
1.5.1 Biología Molecular	20
1.5.2 Actividad fisiológica de la Metaloproteasa de Matriz 9	21
1.5.3 Metaloproteasa de Matriz 9 y cáncer	23
1.6. Metaloproteasa 9 y cáncer de próstata.....	25

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis	29
2.2. Objetivos.....	29

3. Material y métodos

3.1. Recogida de datos	31
3.2. Las muestras.....	32
3.3. Análisis de los resultados	33

4. Resultados.....

35

5. Discusión

5.1. Los objetivos del estudio: diagnóstico y pronóstico	51
5.2. La muestra y el PSA	54
5.3. La metaloproteasa-9: cuestiones metodológicas	59
5.4. La metaloproteasa-9 como marcador diagnóstico.....	61
5.5. La metaloproteasa-9 como factor pronóstico.....	64

6. Conclusiones

69

Bibliografía

71

Anexo 1

93

Anexo 2

96

1. Introducción

1.1. Epidemiología del Cáncer de Próstata

El Cáncer de Próstata es la segunda neoplasia más diagnosticada en el mundo, tan sólo por detrás del cáncer de pulmón. Sin embargo, en términos de mortalidad, ocupa la sexta posición (Baade 2009). En España, el Cáncer de Próstata es el tumor más frecuente en varones en términos de incidencia (excluyendo los tumores de piel no melanoma) (Borràs 2008), y la tercera causa de muerte tras los tumores pulmonar y colorrectal (Granado de la Orden 2006).

Con los datos expuestos, y de manera intuitiva puede apreciarse una importante discordancia entre los datos de incidencia y mortalidad que no existe en otros tumores malignos. El diagnóstico del carcinoma prostático no supone un pronóstico ominoso, ni tan siquiera una alta probabilidad de muerte asociada a esta causa, especialmente en varones añosos, tal como ha sido descrito por Johansson ya en 1989 (Johansson 1989). De esta manera la relación entre tumores diagnosticados y muerte por tumor se aproxima a 5,4 a 1 en estudios americanos (Albertsen 1996, Ries 2001). En estudios españoles, bien sea por la menor utilización del PSA como instrumento de diagnóstico precoz, deficiencias en los registros de incidencia tumoral o por factores raciales es más cercana a 2-3 a 1 (Granado de la Orden 2006).

Pero esta discordancia entre incidencia y mortalidad se acentúa aún más si consideramos la prevalencia del carcinoma prostático subclínico. En varones fallecidos por otras causas la prevalencia del carcinoma prostático diagnosticado anatomopatológicamente es del 30% a los 50 años, elevándose progresivamente con la edad para estabilizarse en cifras del 40-50% en varones mayores de 70 años (Halpert 1963).

La comunidad médica se encuentra pues ante un complejo problema, con repercusiones éticas, económicas y científicas. El cáncer de próstata es una enfermedad extremadamente frecuente con una expresión clínica relativamente limitada. En los pacientes en los que se diagnostica produce sufrimiento

y ansiedad, y en muchos de estos casos se aplica un tratamiento excesivamente agresivo (cirugía o radioterapia radical con intención curativa) con una importante morbi-mortalidad, en pacientes que quizá nunca hubiesen sufrido la enfermedad.

Por otra parte muchos pacientes son diagnosticados en fases avanzadas de su enfermedad, lo que limita las opciones al tratamiento paliativo con un aumento limitado de la esperanza de vida. Se hace imperativo por tanto el desarrollo de un método diagnóstico y pronóstico sensible y fiable que permita ajustar las indicaciones de los diferentes tratamientos actuales.

1.2. Diagnóstico actual del Cáncer de Próstata: El PSA

El principal instrumento del clínico a la hora de realizar un diagnóstico, evaluar el pronóstico y plantear un tratamiento es el Antígeno Prostático Específico (PSA).

El PSA es una serin-proteasa de la familia de las kalicreinas descrita en 1971 (Hara 1971) que se codifica en la región del cromosoma 19q 13.3-13.4 (Lundwall 1989). Su principal función es licuar el coágulo seminal.

En condiciones normales el PSA es sintetizado como una proenzima (proPSA) por las células epiteliales de los acini prostáticos. Es secretado a la luz glandular, donde el propéptido se separa y el proPSA se convierte en PSA activo. Posteriormente sufre una proteólisis, pasando al torrente sanguíneo, donde circula libre como PSA inactivo. Una pequeña cantidad de PSA pasa a la sangre como PSA activo, donde se une inmediatamente a la α 1-antiquimiotripsina y la α 2-macroglobulina (el-Shirbiny 1994, Lilja 1991).

Las células tumorales prostáticas producen menos cantidad de PSA que las benignas, pero la rotura de la membrana basal (por parte del tumor maligno) y con ella la de la barrera hematoprostática facilita un mayor paso a la circulación sistémica tanto de PSA inactivo como de PSA activo y proPSA. Esto conduce a dos consecuencias. La primera es que los niveles de PSA en sangre suelen ser mayores en un paciente con cáncer de próstata y la segunda es que la cantidad de PSA unido a proteínas es mayor, disminuyendo el cociente PSA libre/PSA total (Mikolajczyk 2002).

En pacientes sanos el PSA sérico refleja la cantidad de epitelio prostático que, en general, aumenta con la edad al aumentar el tamaño de la próstata, y presenta grandes variaciones interpersonales (Crawford 1997). Además la expresión de PSA sérico se afecta por múltiples razones, principalmente la hipertrofia prostática benigna (Sershon 1994), procesos inflamatorios (Kawakami 2004, Tchetgen 1997) o el uso de fármacos (Fowke 2009), pero también con el ejercicio físico, el tacto rectal o incluso las relaciones sexuales (Tchetgen 1997).

Siendo el PSA una variable continua e inespecífica, no existe un claro punto de corte que indique la realización de una biopsia prostática. Históricamente se han considerado anormales niveles por encima de 4 ng/ml (una probabilidad aproximada del 20% de padecer un cáncer de próstata) y claramente patológicos por encima de 10 ng/ml (más del 50% de probabilidad de padecer un cáncer prostático) (Coley 1997, Heidenreich 2009), aunque es un dato sujeto a gran controversia especialmente entre autores americanos (Nadler 2005). Esto sucede debido a la gran superposición de cifras entre varones con y sin cáncer de próstata en el rango gris de expresión que va de 4ng/ml a 10ng/ml de PSA (Heidenreich 2009).

Con el fin de aumentar la especificidad de las elevaciones de PSA hasta el rango dudosamente patológico (4-10 ng/ml), se han desarrollado en la práctica clínica nuevos varemos analíticos. Los más estudiados y utilizados en la práctica clínica son el cociente entre PSA libre y PSA total (PSA l/t), el PSA complejo, la densidad de PSA y la velocidad de PSA.

Cociente PSA l/t

Como ha sido expuesto, el cáncer de próstata se asocia a una disminución en la concentración sérica relativa del PSA libre, al romperse la barrera hematoprostática.

El porcentaje de PSA libre puede ser usado para aumentar la especificidad de las elevaciones de PSA total dentro del rango gris que va de 4ng/ml a 10ng/ml, evitando biopsias innecesarias. Cuanto más bajo sea el porcentaje de PSA libre, más posibilidades habrá de diagnosticar un carcinoma prostático en la biopsia (Catalona 1998). No existe un punto de corte claramente definido para este valor, que se establece en cada laboratorio en función de la sensibilidad y la especificidad que se busquen (Lee 2006). En el desarrollo del presente trabajo fue utilizado un punto de corte del 15%, lo que aportaría una sensibilidad teórica del 75% y una especificidad del 45% aproximadamente (Lee 2006).

PSA complejo

Es la medida del PSA ligado a proteínas, y su base teórica es similar a la del cociente PSAI/t, con la ventaja económica de realizar una sola medición analítica (Allard 1998). Se ha estimado un punto de corte para la normalidad de 3.75 ng/ml, con resultados de sensibilidad y especificidad similares a los obtenidos con el uso combinado del PSA total y el cociente PSAI/t (Miller 2001). En la práctica clínica su uso no está suficientemente desarrollado para el “screening” diagnóstico, aunque es usado por algunos centros para la monitorización de la enfermedad (Allard 1999).

Densidad de PSA

Es la relación entre la concentración del PSA sérico y el volumen prostático medido por ecografía transrectal. Su objetivo es discriminar entre pacientes con cáncer y pacientes con HBP. Ha sido establecido un punto de corte en 0.15 ng/ml/cc de próstata, de tal manera que densidades de PSA mayores se consideran sugestivas de ser producidas por un tumor maligno (Benson 1992). Debido a la dificultad de establecer una medida exacta del volumen prostático y al solapamiento de valores entre pacientes con y sin cáncer, en la actualidad esta medida es muy controvertida (Brawer 1993), y no es aconsejada en las guías clínicas de la Asociación Europea de Urología (Heidenreich 2009).

Velocidad de PSA

Se basa en los cambios sufridos por el PSA a lo largo del tiempo. La presencia de un cáncer prostático produce un aumento del PSA sérico más rápido en el tiempo que la presencia de HBP, que suele producir valores elevados pero estables (Smith 1994). Se ha estimado que un aumento superior a 0.75 ng de PSA al año es claramente sugestivo de cáncer prostático (Carter 1992), y mayor a 2 ng anuales cuando el tumor no está organoconfinado y por tanto no es curable (D'Amico 2004).

Sin embargo procesos inflamatorios pueden producir rápidas elevaciones del PSA, el cáncer puede producir valores más bien estables y esto, junto con las grandes variaciones individuales que se producen, disminuye enormemente la especificidad del parámetro (Raaijmakers 2004), por lo que su uso es limitado en la práctica clínica y queda relegado a un valor orientativo.

De esta manera, tal como se ha venido haciendo en la práctica urológica europea podría estratificarse a los pacientes en tres grupos según su nivel de PSA:

- **PSA menor de 4 ng/ml:**

En el rango considerado normal, no precisan otras exploraciones.

- **PSA 4-10 ng/ml:**

La biopsia debe indicarse si existen otros parámetros de riesgo como $PSA\ 1/t < 0.15$.

- **PSA mayor de 10 ng/ml:**

La biopsia está claramente indicada.

Entre 4 y 10 ng de PSA por ml de suero la sensibilidad una biopsia transrectal ecodirigida en sextante (recomendada hasta la penúltima edición de las “European Guidelines for Prostate Cancer” de la Asociación Europea de Urología) se sitúa en un 70-80%, mientras que la especificidad lo hace en 60-70% (Brawer 1999). Estas cifras muestran un valor predictivo positivo de tan solo el 30%, lo que se traduce en la realización de unas 100 biopsias prostáticas para diagnosticar 30 casos de cáncer prostático.

En la actualidad la Asociación Europea de Urología aconseja incrementar el número de cilindros por biopsia hasta un mínimo de 10 o el uso del nomograma de Viena, que protocoliza el número de cilindros tomados en función de la edad del paciente, el tamaño prostático y la concentración de PSA sérico (Remzi 2005). Con este nuevo protocolo aumenta la capacidad diagnóstica de la biopsia hasta un valor predictivo positivo de 66%, con lo que casi la mitad de las biopsias prostáticas siguen realizándose innecesariamente.

Por otra parte, la biopsia de próstata no es con mucho una técnica ideal. Presenta una morbilidad no despreciable y una mortalidad escasa pero existente (Rodríguez 1998). El malestar y las complicaciones que se derivan de su realización imponen ajustar su indicación y la agresividad (zonas biopsiadas, número de cilindros) con la que la que va a realizarse a las circunstancias de cada paciente.

Además el diagnóstico de sospecha del cáncer de próstata no queda despejado tras un resultado negativo en la biopsia, sea cual sea el protocolo utilizado, dada la aleatoriedad en la toma de las muestras. La elevación persistente del PSA obliga a un estrecho seguimiento con realización de analíticas frecuentes y la indicación ocasional de repetidas biopsias, lo que ocasiona un importante impacto económico en los sistemas de salud. En Asturias, en el área sanitaria V (Gijón) se realizan anualmente más de 12.000 determinaciones anuales de PSA (Cepeda 2005). Pero no es posible cuantificar el impacto emocional que supone para los pacientes la sospecha de padecer un cáncer de próstata y someterse a una biopsia transrectal.

1.3. Estadificación y pronóstico del cáncer de próstata

Cuando un paciente ha sido diagnosticado de un cáncer de próstata, el planteamiento clínico se basa en la dicotomía curable-no curable. Para inferir la respuesta a esta pregunta y plantear un tratamiento se utiliza la información proveniente de tres variables: el estadio clínico, los resultados de la biopsia y el PSA preoperatorio. El morbi-mortalidad que supone una terapia de intención curativa sólo es asumible si la probabilidad de curación es alta.

1.3.1. El estadio clínico

En la práctica clínica la estadificación se basa en tres exploraciones: el tacto rectal (o la ecografía transrectal), la tomografía axial computerizada (TAC), y la gamma-grafía ósea. El objetivo es determinar si el tumor se encuentra diseminado tal como se muestra en la siguiente tabla ($T \geq 3$, $N \geq 1$ o $M \geq 1$) y en ese caso evitar un inefectivo tratamiento radical con importante morbilidad y mortalidad. El estadio se basa en la clasificación TNM de la UICC de 2009 (Sobin LH, Gospodariwicz M, Witterkind C (eds). TNM classification of malignant tumours. UICC International Union Against Cancer. 7th edn. Wiley-Blackwell, 2009 DCC; pp. 243-248) –ver cuadro en página siguiente–. Su principal problema es su escasa sensibilidad, lo que ocasiona gran número de tratamientos innecesarios (Walsh 1994).

Tumor primario

TX No puede evaluarse.

T0 Sin evidencia de tumor.

T1 Tumor no palpable y no visible.

T1a Hallazgo incidental en RTU \leq 5% del material resecado.

T1b Hallazgo incidental en RTU $>$ 5% del material resecado.

T1c Diagnóstico por biopsia tras elevación del PSA.

T2 Tumor confinado en la próstata.

T2a Ocupa la mitad de un lóbulo o menos.

T2b Ocupa más de la mitad de un lóbulo pero no ambos.

T2c Ocupa ambos lóbulos prostáticos.

T3 El tumor se extiende por fuera de la cápsula prostática.

T3a Extensión extracapsular.

T3b Invasión de las vesículas seminales.

T4 Extensión de estructuras vecinas como cuello vesical, esfínter externo, recto, músculo elevador o pelvis.

Nódulos linfáticos regionales

NX Los linfáticos regionales no pueden ser evaluados.

N0 Sin metástasis en los linfáticos regionales.

N1 Metástasis en los nódulos linfáticos regionales.

Metástasis a distancia

MX Las metástasis a distancia no pueden ser evaluadas.

M0 Sin metástasis a distancia.

M1 Metástasis a distancia.

M1a Metástasis en nódulos linfáticos no regionales.

M1b Metástasis en hueso.

M1c Metástasis en otras localizaciones.

El tacto rectal

Sólo es capaz de evaluar de manera grosera el tumor primario, y la correlación entre éste y el estadio patológico tiene lugar sólo en un 50% de los casos (Spiegelman 1986).

Ecografía transrectal

Es el método más utilizado para la valoración prostática, pero el 60% de los tumores no son visibles mediante esta técnica. Además es poco sensible para valorar la extensión extraprostática, infraestadiando hasta en el 60% de los casos (Enlund 1990). Por esta razón no ha sido validada por la Asociación Europea de Urología para la estadificación (Heidenreich 2009).

Tomografía axial computerizada

Su principal función consiste en la valoración de los nódulos linfáticos regionales, pero dado que el único parámetro valorado es el tamaño, su sensibilidad es escasa. En un paciente asintomático y con un PSA menor de 20 ng/ml la posibilidad de un hallazgo positivo en el TAC es menor al 1% (Wang 2006). Su valor radica en su alta especificidad (93-96%), que obliga a una linfadenectomía de estadificación en caso de un hallazgo positivo (Wolf 1995).

Gamma-grafía ósea

Sigue siendo el método más sensible para detectar metástasis óseas, y de gran utilidad en el seguimiento del paciente (McGregor 1978), pero en el caso de los pacientes en los que se plantea un tratamiento radical (bajo valor de PSA, ausencia de metástasis linfáticas...) las metástasis óseas no suelen haberse producido aún o no son lo suficientemente notorias, por lo que presenta muy escasos resultados positivos en el momento de la estadificación prequirúrgica.

1.3.2. La biopsia de próstata

La limitada sensibilidad del estadio clínico obliga a la valoración de otras variables, con el fin de disminuir el sobretreatmento, Esta información se obtiene principalmente del grado Gleason de la biopsia pero también de otros parámetros como el número de cilindros afectados, el porcentaje de afectación de los cilindros o la invasión perineural, todos estos de menor importancia.

En 1966 D. F. Gleason desarrolla un sistema de clasificación para los adenocarcinomas prostáticos que valora el patrón de diferenciación glandular y el patrón de crecimiento tumoral en el estroma prostático. Abarca de 1 a 5, en el que el grado 1 significa el patrón más diferenciado y el 5 el más indiferenciado, y por lo tanto el de mayor capacidad maligna (Gleason 1966). La observación de numerosos pacientes permitió concluir que la mortalidad de los mismos con dos tipos diferentes de tumor prostático representaba tasas intermedias entre

el peor y el mejor. Se llegó a la conclusión de que el comportamiento tumoral se relaciona de manera más estrecha con el grado histológico medio (Gleason 1974).

Hoy en día la clasificación modificada del grado combinado de Gleason es utilizada mundialmente en las descripciones anatomopatológicas y en los nomogramas predictivos, considerándose patrón de referencia dada su fiabilidad pronóstica (Billis 2008). Consiste en la suma de los grados Gleason de los dos tumores con mayor volumen en la biopsia de tal manera que el grado menor es el 2 (1+1) y el mayor el 10 (5+5). Se consideran tumores de bajo grado cuando el grado combinado es menor a 5, de grado medio cuando la suma es 5 o 6, y de alto grado cuando es mayor va de 7 a 10 (Epstein 2005).

Estas gradaciones guardan una relación estrecha con la supervivencia en varones no tratados (Johansson 1989), con la extensión extraprostática de la enfermedad (Guimaraes 2008) y con la progresión tras un tratamiento radical de intención curativa (Guimaraes 2008).

Pero la gradación de Gleason presenta un importante problema. Debido a la multicentricidad tumoral y a la escasa cantidad de tejido examinado en la biopsia, las piezas de prostatectomía tienden a presentar tumores de mayor grado que las biopsias. La correlación entre ambas disminuye cuanto menor es el Gleason de la biopsia, llegando tan solo a un 15% en tumores de bajo grado (Köksal 2000, Stav 2007).

1.3.3. El PSA preoperatorio

La concentración de PSA sérico previo a la realización de la biopsia prostática es la tercera de las variables imprescindibles para la estadificación pronóstica en el cáncer de próstata. Estadísticamente los niveles de PSA sérico aumentan al aumentar el estadio clínico del tumor, pero cuando se mide éste en un paciente individual, tiene una capacidad limitada para predecir el estadio patológico. Además de la producción de PSA por parte del tejido prostático benigno, no hay una correlación individual directa entre su concentración y el estadio clínico o patológico (Hudson 1989, Partin 1990).

1.3.4. Conclusiones acerca del diagnóstico y estadificación pronóstica

Es por tanto necesario desarrollar nuevos marcadores. Por un lado sería preciso un nuevo marcador diagnóstico que permita complementar al PSA, aumentando la sensibilidad para evitar escapes al diagnóstico y la especificidad para

evitar biopsias innecesarias. Por otro lado, sería muy interesante un marcador pronóstico que ayude a diferenciar los carcinomas agresivos y potencialmente curables en los que se deberá indicar un tratamiento radical. Por último, y de manera ideal, debería ser capaz de discriminar aquellos tumores no curables para evitar el sobretratamiento.

1.4. Las Metaloproteasas de Matriz Extracelular

Las Metaloproteasas de Matriz Extracelular (MMP) son una familia de enzimas proteolíticas que se caracterizan por presentar un ión Zinc en su dominio catalítico, bien conservado (Visse 2003). Desde que se descubriera por primera vez la producción de un nuevo enzima proteolítico responsable de la reabsorción de la cola del renacuajo (Gross 1965), han sido descritos 24 genes codificadores de metaloproteasas en el ser humano (Puente 2003). Éstos incluyen un duplicado de la MMP-23, por lo que tan sólo se expresan 23 proteínas (Nagase 2006).

Inicialmente en función de sus substratos, actualmente se clasifican en función de su estructura. Se organizan en torno a un dominio catalítico que une Zinc, un propéptido encargado de mantener la latencia enzimática y un péptido señal que regula su secreción. Además, la mayoría presenta un dominio hemopexina C-terminal del que depende la especificidad de los substratos y la actividad de los inhibidores (Overall 2002)

En función de su secuencia de aminoácidos, organización de los dominios y la especificidad hacia sus substratos pueden clasificarse en seis grupos:

Colagenasas: MMP-1, MMP-8, MMP-13: Tienen la estructura arquetípica descrita, y degradan el colágeno intersticial tipo I, II y III. Además participan en los procesos de señalización celular y juegan un importante papel en procesos patológicos como el cáncer (Ala-aho 2005).

Gelatinasas: La gelatinasa A (MMP-2) y la gelatinasa B (MMP-9). Estructuralmente añaden 3 repeticiones de un dominio fibronectina tipo II en el dominio catalítico, lo que les confiere especificidad para unirse al colágeno, la laminina y la gelatina. Además la MMP-2 puede digerir el colágeno tipo I, II y III. Probablemente las metaloproteasas más estudiadas por su participación en los procesos de invasión y metástasis tumoral (Van den Steen 2002).

Estromalisinas: Estromalisina 1 (MMP-3) y Estromalisina 2 (MMP-10). También mantienen la configuración típica descrita. Además de la degradación de la matriz extracelular, actúan sobre otras proMMP, especialmente sobre la proMMP1. La MMP-11 puede incluirse en este grupo, aunque las diferencias en especificidad de sustrato y estructura hace que habitualmente se agrupe en “otras MMPs”. Participan en la cicatrización dérmica y de otros epitelios (Saarialho-Kere UK 1998).

Matrilisinas: matrilisina 1 (MMP-7) y matrilisina 2 (MMP-26). Carecen de dominio hemopexina. Además de digerir varios componentes de la matriz extracelular, actúan sobre proteínas de superficie de membrana. Además de participar en numerosos procesos tumorales, actúan en los procesos inflamatorios fisiológicos y patológicos (Wielockx 2004).

Metaloproteasas de membrana: Agrupa 6 MMPs, de las cuales 4 son proteínas transmembrana de tipo I (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24) y las otras dos están ancladas a fosfatidilinositol (MMP-17 y MMP-25). Todas ellas degradan varios componentes de la matriz extracelular, pero además, a excepción de la MT4-MMP, son capaces de activar la proMMP-2. Tienen importancia en los procesos de migración celular (Zucker 2003).

Otras metaloproteasas: Abarca metaloproteasas que no pueden ser agrupadas en otras categorías.

La Metaloelastasa (MMP-12), expresada principalmente por macrófagos, es esencial para su migración, y su sustrato principal es la elastina. Papel crucial en los procesos de inflamación y fibrosis pulmonar (Néan 2005).

MMP-19: Afecta a la proliferación, adhesión y migración celulares, pero su papel fisiopatológico es poco conocido. Parece actuar sobre la actividad de los linfocitos T, especialmente en la respuesta inmune cutánea (Beck 2008).

Enamelisina: (MMP-20): Digiere la amelogenina en los dientes (Zhu 2008)

MMP-23: Expresada en tejido reproductivo, carece de dominio hemopexina, y su función no es del todo conocida (Velasco 1999).

Epilisina: MMP-28, expresada en queratinocitos, participa en la reparación de las heridas. Incrementa la expresión y la actividad de la MMP-2 (Rodgers 2009).

Siendo la degradación de la matriz extracelular la primera y más evidente de las acciones descritas de las metaloproteasas, la variabilidad estructural y la diversidad de los sustratos confiere una enorme complejidad a los procesos biológicos en los que participan, interactuando entre ellas y con otros enzimas en forma de redes y cascadas enzimáticas.

Uno de los procesos donde se presenta una mayor expresión de metaloproteasas es el ciclo ovárico, el crecimiento y regresión del endometrio en los ciclos menstruales, la implantación embrionaria y la gestación. Los cambios hormonales parecen ser el mecanismo de control del sistema metaloproteasas-inhibidores (TIMPs). Su incorrecta regulación parece ser la causa de patologías como los quistes ováricos, la endometriosis, el embarazo extrauterino, los fallos de implantación, la ruptura prematura de membranas o los carcinomas de ovario o útero (Curry 2003).

También participan de manera muy activa en la remodelación tisular que tiene lugar durante el desarrollo, como también en los procesos de migración celular y en los procesos de señalización intercelular que provocan la diferenciación desde células madre a líneas mioblásticas, neuroblásticas, osteoblásticas, condroblásticas, entre otras. (Manello 2006). Han sido descritos múltiples defectos de organogénesis (hepáticos, pulmonares, cardíacos, neurológicos y osteoarticulares) en relación con alteraciones en la regulación de las metaloproteasas. La remodelación posterior de los tejidos ha sido estudiada en múltiples sistemas, intervienen en la reparación de las heridas (Gill 2008), desarrollo mamario (Benaud 1998), angiogénesis y remodelación vascular (Raffetto 2008), osificación del cartílago, remodelado óseo y reparación de fracturas (Krone 2008), entre otros.

1.4.1. Las Metaloproteasas y el cáncer

La patología tumoral engloba gran número de enfermedades en las cuales uno o varios clones de células mutadas crecen y se diseminan de manera desordenada mediante la alteración de los procesos fisiológicos. En todas las estirpes tumorales tienen lugar de manera genérica los mismos pasos. En todos ellos ha sido demostrada la participación de las metaloproteasas:

- Supervivencia celular mediante la inhibición de la apoptosis.
- Invasión de estructuras cercanas y entrada al torrente sanguíneo.
- Evasión de la respuesta inmune.
- Implantación metastática.
- Angiogénesis.

Supervivencia celular

La evasión de la muerte celular programada es considerada como un paso imprescindible del desarrollo tumoral (Hanahan 2000). Varias metaloproteasas, especialmente la MMP-7, han mostrado su contribución en los fenómenos antiapoptóticos. En el caso de la MMP-7, produce una forma soluble de la proteína Fas ligando (Fas-L), generando una débil (insuficiente) y constante inducción apoptótica, lo que activa los programas antiapoptóticos y permite a la célula adquirir sucesivas mutaciones (Fingleton 2001). Este mecanismo es también responsable de la resistencia tumoral a varios agentes quimioterápicos como el 5-fluorouracil o la doxorrubicina (Mitsiades 2001). Otras metaloproteasas con capacidad de inhibir la muerte celular son la MMP-11 (Wielockx 2001), la MMP-3 o la MMP-9 (Van Themsche 2007).

Invasión tumoral

Ha sido la primera actividad tumoral asociada a las metaloproteasas, especialmente en el caso de la MMP-2 y la MMP-9 (Liotta 1980). La invasión celular depende no sólo de la degradación de la matriz extracelular, sino también de la regulación de las uniones intercelulares, la motilidad celular y las relaciones entre la célula y el intersticio. Aunque se han relacionado muchas MMP con la capacidad de invasión (Pollete 2004), la MMP-14 (o MT1) parece ser la más activa en esta función. Regula la migración celular degradando las fibras de colágeno y reordenándolas en haces paralelos o túneles a través de los cuales columnas de células tumorales pueden atravesar la matriz extracelular. Se forman así tractos que permiten el avance celular en masa (Friedl 2008).

Evasión de la respuesta inmune

La asociación entre células inflamatorias y tumorales es bien conocida, y cada vez existen más evidencias de que esta asociación contribuye al desarrollo tumoral (Coussens 2002). Las metaloproteasas producidas en el microambiente tumoral parecen ser en gran manera responsables del reclutamiento inmunológico (Fingleton 2006). La capacidad de alterar el comportamiento de la respuesta inmune mediante la proteólisis y degradación específicas de las citocinas es una de las funciones más novedosamente estudiadas de las metaloproteasas. Su importancia radica tanto en la relación con las células inmunes en la localización tumoral primaria como en el escape a la respuesta inmune una vez han pasado las células a los vasos sanguíneos. Varias metaloproteasas, especialmente la MMP-9, tienen capacidad para atenuar la respuesta de los linfocitos CD8

citotóxicos infiltrados en el estroma tumoral mediante el lavado de IL2Ralfa o de su receptor en la superficie celular de los CD8 (Sheu 2001). Asimismo se ha observado la capacidad de la MMP-14 para actuar sobre factores de la cascada del complemento (Rozanov 2002).

Implantación metastática

Para que las células tumorales puedan extravasarse de la circulación sistémica a nuevos nichos de crecimiento es necesario que se adhieran al endotelio de los vasos. Este mecanismo está facilitado por la asociación con las plaquetas (que además facilita la evasión de la respuesta inmune). La actividad proagregante de algunas metaloproteasas podría favorecer este mecanismo (Sawicki 1997). Una vez adheridas al endotelio vascular, deben extravasarse para formar la metástasis definitiva. En este paso ha sido demostrada la actividad de ciertas metaloproteasas como la MMP-2, aunque el mecanismo no es bien conocido (Kargozaran 2007).

Angiogénesis

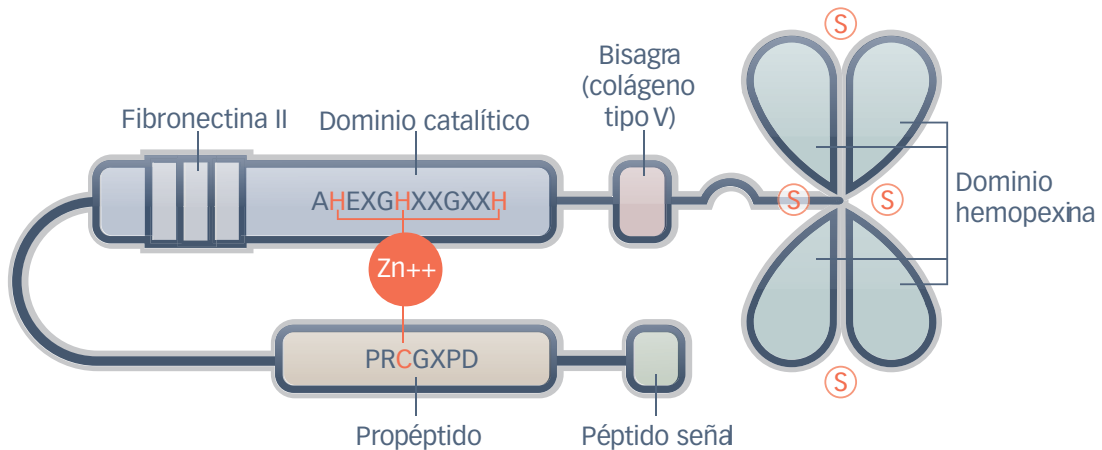
Uno de los procesos de mayor importancia en el desarrollo tumoral, la relación que guardan las metaloproteasas con la formación y desarrollo de neovasos tumorales ha sido ampliamente estudiada y está muy documentada (Hinsbergh 2008). La formación vascular tumoral depende de una compleja red de factores pro/antiangiogénicos, activación e inhibición de factores de crecimiento, citokinas y células progenitoras endoteliales. En este proceso la MMP-2 y la MMP-9 juegan un papel crucial (Bergers 2000). La MMP-9 no sólo ejerce un papel estimulante de la angiogénesis sino que también ejerce un papel inhibitor (Hamano 2003). Otras MMP relacionadas con este proceso son la MMP-19, que ejerce un efecto inhibitor en los escalones iniciales del proceso (Jost 2006), o la MT1-MMP, única metaloproteasa que parece indispensable para la formación de neovasos (Chun 2004).

1.5. La Metaloproteasa de Matriz 9 (MMP-9)

1.5.1. Biología molecular

La metaloproteasa de matriz 9 o gelatinasa B está codificada en un gen situado en el cromosoma 20 q12.2-q13.1 (Zhang 1999) Estructuralmente la MMP-9 es una de las metaloproteasas más complejas. Además de presentar el péptido

señal, el propéptido inactivador, dominio activo, el dominio con Zn y el dominio carboxiterminal hemopexina, su particularidad reside en presentar además un dominio ligador de gelatina con tres repeticiones de fibronectina entre el dominio activo y el dominio ligador de Zn (responsable de la unión a gelatina, laminina, colágeno I y colágeno IV) y una región bisagra (Van den Steen 2002).



La proteólisis del propéptido o su simple separación en el caso de algunos sustratos permite la exposición del dominio activo y el Zinc, lo que da lugar a la forma activa de la gelatinasa (Van den Wart 1990). Aunque en la especificidad al sustrato es importante la configuración espacial de éste, depende principalmente de su secuencia de aminoácidos (Imper 1998). Además de los diferentes tipos de colágeno, la MMP-9 actúa sobre gran cantidad de sustratos, participando en múltiples procesos.

La actividad de la MMP-9 tiene lugar por cinco mecanismos diferentes: transcripción genética, secreción, activación, inhibición y glucosidación (St-Pierre 2004, Van den Steen 2002). Su expresión está circunscrita a un número relativamente escaso de tipos celulares, en cada uno de los cuales precisa un estímulo concreto, que pueden ser factores de crecimiento, citoquinas, oncogenes, hormonas, iones metálicos o factores de estrés oxidativo entre otros, con unos mecanismos de regulación extremadamente complejos (Vincenti 2007).

1.5.2. Actividad fisiológica de la Metaloproteasa de matriz-9

La actividad de la MMP-9 es crucial en múltiples procesos fisiológicos, principalmente en los que impliquen remodelación tisular. Los más estudiados son el ciclo reproductivo, el crecimiento y desarrollo, la reparación de las heridas, la inflamación y la remodelación vascular.

A modo de ejemplo:

En el ciclo reproductivo femenino la MMP-9 actúa principalmente remodelando el endometrio para adaptarlo a los cambios mediados por hormonas (Curry 2003). Está presente en el folículo preovulatorio, favoreciendo su ruptura, desde el día 7 hasta la ovulación (Goldmann 2004). A partir del día 14 del ciclo su expresión aumenta en el endometrio, acondicionándolo para la implantación del blastocisto. En la menstruación degrada el tejido, siendo producida por leucocitos infiltrados (Jeziorska 1996). Es muy interesante observar que durante la invasión del endometrio por parte del trofoblasto la actividad colagenolítica de la metaloproteasa 9 es imprescindible, compartiendo circuitos moleculares con el proceso de invasión de las células tumorales (Ferretti 2007).

En el crecimiento y desarrollo tempranos la metaloproteasa 9 juega un papel central en la neurogénesis, tanto en la mielinización axonal como en el proceso de vascularización cerebral embrionarios. Su expresión varía en una precisa secuencia temporal durante la generación y desarrollo temprano de otros órganos como el epitelio bronquial, los alveolos pulmonares, el tiroides, esófago o el cartílago (Cañete-Soler 1995). Participa también en la nefrogénesis y el desarrollo de las gónadas masculinas (El Ramy 2005). Tiene una fuerte presencia durante la erupción dental y la reabsorción ósea osteoclástica (Sahlberg 1999) y de manera remarcable, su presencia es abundante en la placa cartilaginosa de crecimiento óseo, donde facilita la invasión por capilares neoformados, permitiendo el reemplazamiento del tejido cartilaginoso por el óseo (Lee 1999).

En el contexto de la inflamación la MMP-9 está principalmente regulada por la interleucina 1 y el $\text{TNF}\alpha$. (Rodríguez 2007). Es producida por varias clases de leucocitos, principalmente por los monocitos y neutrófilos, pero también por los linfocitos, regulando su activación (Vadillo-Ortega 2005). La metaloproteasa 9 actúa de manera importante en varias patologías inflamatorias, como las enfermedades cardiovasculares, la artritis reumatoide, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el lupus eritematoso sistémico y la esclerosis múltiple. En el caso del EPOC, la producción incrementada de MMP-9 por los neutrófilos y macrófagos en los bronquios actúa de manera directa provocando daño pulmonar. Además de manera indirecta esta MMP-9 actúa como modulador de citoquinas y proteasas, acentuando este daño. En el caso de la esclerosis múltiple el daño se produce al aumentar la MMP-9 la permeabilidad de

la barrera hemato-cerebral, lo que permite la infiltración de leucocitos en el sistema nervioso central, degradación de la mielina de los axones y posterior daño neuronal (Muroski 2008). Los valores circulantes de MMP-9 han sido observados como un valor pronóstico del nivel de inflamación vascular sistémica y predictores de muerte por eventos cardiovasculares (Blankenberg 2003).

1.5.3. Metaloproteasa de matriz 9 y cáncer

La metaloproteasa 9 ha sido estudiada en múltiples escalones de la progresión tumoral, principalmente en los procesos de invasión, metástasis y angiogénesis, pero no menos importante es el rol que asume en la creación de un microambiente tumoral adecuado (Egeblad 2002).

Metaloproteasa 9 en el cáncer de mama

Existen múltiples referencias bibliográficas que relacionan el cáncer de mama con la MMP-9, en ocasiones con resultados contrapuestos. En muestras tisulares de tejido neoplásico parece claro que la expresión de MMP-9 se asocia a otros marcadores de invasión y metástasis como el factor de crecimiento vascular endotelial (Jobim 2008). También se relaciona con la expresión de oncogenes como el AP-2 y el HER2 (Pellikainen 2004). Estudios in vitro no parecen relacionar la sobreexpresión de MMP-9 con líneas celulares agresivas, aunque el resultado está muy condicionado por los métodos de estudio (Kousidou 2004).

En cuanto a la significación clínica de la expresión tisular de MMP-9, aunque algunos estudios no muestran relación con factores pronósticos (grado histológico, tamaño tumoral, afectación ganglionar u otros) (Jobim 2008), en la mayoría de los trabajos publicados sí parece existir esta relación (Pellikainen 2004, Wu 2008, Kousidou 2005). Han sido encontrados mayores niveles de expresión de MMP-9 sérica (Wu 2008) o plasmática (Ranuncolo 2003) en tumores avanzados o de peor pronóstico. De hecho, ha sido demostrado in vitro que la inhibición de la génesis de MMP-9 mediante el uso de Genisteína disminuye la capacidad metastática de líneas celulares de cáncer de mama (Kousidou 2005).

La Metaloproteasa 9 en el cáncer de colon

Existe amplia bibliografía que muestra relación entre el cáncer de colon, sigma y recto y la MMP-9. Estudios in vitro relacionan la sobreexpresión de MMP-9 con una mayor capacidad metastática del adenocarcinoma de colon, lo que se concluye también en abundantes estudios clínicos, aunque el desarrollo de inhibidores

de la MMP-9 no ha dado los resultados terapéuticos esperados (Mook 2004). La primera evidencia clínica del valor como marcador pronóstico de la MMP-9 se tuvo en 1996 al demostrar que una mayor expresión de MMP-9 RNA en tejido tumoral se relacionaba con una mayor tasa de recidiva y peor supervivencia (Zeng 1996). Posteriormente, aunque existe algún artículo que no encuentra relación entre la expresión tisular de MMP-9 y el pronóstico (Oberg 2000), la mayoría de los estudios posteriores sí lo demuestran, incluyendo la importante interacción valanceada con el inhibidor de membrana RECK (Takeuchi 2004, Cho 2007).

La expresión plasmática de la MMP-9 en pacientes con adenocarcinoma de colon muestra resultados contradictorios. Algunos estudios no encuentran relación entre el nivel preoperatorio y el pronóstico (Oberg 2000), mientras otros encuentran niveles de expresión superiores en pacientes con metástasis (Ishida 2003) o valor pronóstico en la reducción de los niveles tras la resección tumoral (Tutton 2003).

La metaloproteasa 9 en el cáncer de pulmón

El incremento de expresión de la MMP-9 en tejido tumoral frente a tejido sano adyacente o tejido de pacientes con lesiones benignas, valorado como expresión de MMP-9 mRNA da una idea de la importancia que tiene esta proteína para el desarrollo tumoral (Sfrank 2009). Este dato no siempre se certifica como expresión protéica, quizá por el uso de técnicas menos sensibles (Suzuki 1998-1999), ya que estudios posteriores si acreditan la mayor presencia de MMP-9 en tejido tumoral, aportando además a este hallazgo un valor pronóstico (Ylisirniö 2000, Hoikkala 2006).

La expresión sistémica elevada de MMP-9 parece tener también un valor pronóstico. Se han demostrado diferencias entre pacientes fumadores y no fumadores, y hay grandes incrementos en pacientes con carcinoma pulmonar metastático (Yang 2005). El valor pronóstico parece demostrarse en la inmensa mayoría de los estudios realizados tanto en suero (Ylisirniö 2000, Hoikkala 2006), o en plasma (Yang 2005).

La Metaloproteasa 9 en el cáncer de riñón

La metaloproteasa 9 en el cáncer de riñón ha demostrado incrementar la capacidad de invasión en estudios in vitro (Inamoto 2007). En la práctica clínica la expresión aumentada en tejido tumoral de MMP-9 ha sido asociada a otros signos de mal pronóstico como un estadio más elevado de la enfermedad (Miyata 2004), presencia de síntomas en el momento del diagnóstico (Harada 2006) y disminución de la esperanza de vida asociada a tumor renal (Miyata 2004, Harada 2006).

La Metaloproteasa 9 en el cáncer de vejiga

La actividad gelatinolítica de la MMP-9 (junto con la MMP-2) ha sido observada como un factor de importancia para el desarrollo de la biología tumoral, estando ligada al grado celular tumoral, el estadio y la mortalidad específica para tumor (Kawamura 2004). La medida en suero de la mmp-9 podría también ser útil para predecir el pronóstico, pues su elevación se ha visto asociada a tumores de mayor grado y estadio (Guan 2003). Ha sido estudiada también en orina, donde ha demostrado no sólo un valor pronóstico sino también capacidad diagnóstica (Roy 2008).

1.6. Metaloproteasa de Matriz 9 como marcador del Cáncer de Próstata

En el carcinoma prostático, como en el caso de otros tumores, la MMP-9 ejerce una función clave en el proceso de desarrollo, invasión y desarrollo de metástasis (Clarck 2007). Es especialmente importante el papel que parece tener en la formación de neovascularización (London 2003), mientras que el efecto que tiene sobre el crecimiento tumoral es controvertido (Nabha 2006). Estudios recientes han comenzado a encontrar relación entre los polimorfismos genéticos de la MMP-9 y el riesgo de padecer un carcinoma prostático, así como un factor de importancia en su agresividad (Sfar 2007).

Ha sido demostrado un nexo de unión entre el receptor androgénico y la expresión de la MMP-9. La actividad del receptor androgénico parece ser fundamental en la regulación de la MMP-9, demostrándose recientemente *in vitro* que el bloqueo de este receptor disminuye la invasividad de líneas celulares de cáncer de próstata mediante la regulación a la baja de la actividad de la metaloproteasa 9 (Miyamoto 2005, Hara 2008). Otros mecanismos de regulación de la MMP-9 estudiados en líneas celulares prostáticas son factores de crecimiento como el TGFbeta-1, que eleva su nivel de transcripción (Sehgal 1999). Además el papel regulador del TGFbeta-1 actúa facilitando la comunicación paracrina entre células cancerosas y epiteliales, de tal manera que la MMP-9 jugaría también un papel de comunicación intercelular necesario para la invasión tumoral (Wilson 2002, Greiff 2002). Ha sido demostrado *in vivo* el papel de otras moléculas como la matrilisina-2 o la MMP-26 en la activación de la MMP-9, asociado esto a un aumento en la capacidad invasiva (Zhao 2003).

Estos hallazgos biológicos se sustentan en los estudios clínicos realizados sobre tejido prostático. Ha sido demostrado una alteración del balance proteolítico entre tejido prostático benigno y tejido canceroso, encontrándose el mRNA de la MMP-9 en mucha mayor cantidad en muestras tumorales cancerosas (Lichtinghagen 2002, Lichtinghagen 2003), como también han sido encontrados unos mayores niveles de proteína en tejido canceroso que en sano (Zhong 2008, Escaff 2010^a, Escaff 2010b). La elevación de los niveles de metaloproteasas, especialmente en el tejido estromal que rodea a los tumores prostáticos, ha sido propuesto recientemente como marcador diagnóstico de baja sensibilidad, pero de muy alta especificidad (Escaff 2010b).

La agresividad del carcinoma prostático ha sido relacionada con el grado de expresión tisular de la MMP-9, encontrándose *in vitro* una correlación entre la expresión y actividad de la MMP-9 y la capacidad metastática e invasiva del cáncer prostático (Zhang 2006). Todos estos hallazgos han quedado refrendados al encontrar una relación entre el grado de expresión de MMP-9 y factores pronósticos como el grado Gleason, la afectación ganglionar, la afectación de las vesículas seminales o el tamaño tumoral tras prostatectomía radical (Miyake 2008). De manera muy reciente el nivel de MMP9 del estroma peritumoral ha demostrado ser un factor independiente con capacidad para predecir recidiva bioquímica tras prostatectomía radical (Escaff 2010c).

Existen pocos trabajos que estudien la expresión sistémica de MMP-9 en el carcinoma prostático. En animales de laboratorio con tumores inducidos se ha observado una mayor expresión de MMP-9 plasmática que en aquellos sin tumor, demostrando además una regresión en el tamaño tumoral en las ratas tratadas con un inhibidor de la MMP-9 (Jung 2003).

Hasta la fecha el autor tiene noticia de tan sólo cinco trabajos publicados que estudian la expresión sérica de la metaloproteasa 9 en pacientes con cáncer de próstata. Por orden cronológico:

El primer trabajo fue publicado por Jung en 2001 en "Clinica Chimica Acta". Estudia las diferencias de expresión de MMP-9 en 68 controles sanos, 33 pacientes con cáncer prostático y 33 pacientes con tumores renales, al

medir la proteasa en suero o plasma. No encuentra diferencias entre la expresión de MMP-9 en los pacientes sanos o con cáncer de próstata, pues la medición en suero resulta artefactada (Jung 2001).

El segundo trabajo fue publicado por Sauer en 2004 en “Virchows Archives”. Estudia la expresión y actividad de la MMP-9 en suero, cilindros de biopsia prostática y piezas de prostatectomía radical en 97 pacientes, pero con tan sólo 8 controles. Encuentra una elevación de la expresión sérica en los pacientes con cáncer de próstata en relación con los sanos, y además observa también que esta elevación se relaciona con el grado Gleason de la pieza de prostatectomía (Sauer 2004).

El tercer trabajo fue publicado por Morgia en 2004 en “Urological Research”. Estudia la expresión plasmática y la actividad enzimática de la MMP-9 en 40 pacientes con cáncer de próstata y 40 pacientes sin tumor. Encuentra una expresión y actividad plasmáticas superiores en pacientes con cáncer mayor cuanto mayor es el estadio tumoral y concluye que puede ser de utilidad en la monitorización de pacientes con enfermedad avanzada, especialmente en aquellos con tumores muy indiferenciados que no marquen PSA (Morgia 2004).

El cuarto trabajo fue publicado por Zhang en 2004 en “Prostate Cancer and Prostatic Diseases”. Estudia la actividad enzimática de la MMP-9 en el suero de 46 controles y 25 pacientes con cáncer de próstata. Encuentra una actividad creciente estadísticamente significativa entre pacientes sanos, con hiperplasia prostática benigna, cáncer prostático localizado y cáncer diseminado.

El quinto trabajo fue publicado por Cicco en 2008 en “Current Cancer Drug Targets”. Estudia los niveles séricos y plasmáticos de MMP-9 en 162 pacientes con cáncer de próstata, sin encontrar relación estadística entre los niveles de expresión y el estadio patológico postquirúrgico, el Gleason de la pieza o la supervivencia libre de enfermedad.

El presente trabajo presenta un estudio de los niveles de expresión plasmática de la Metaloproteasa de Matriz 9 en pacientes sospechosos de padecer un carcinoma de próstata, de manera prospectiva y con un tamaño de la muestra muy superior al de los anteriores trabajos.

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

1. Deberían existir diferencias en los niveles plasmáticos de MMP-9 entre pacientes con histología prostática benigna y con carcinoma prostático, debidas a la mayor capacidad invasiva de las células malignas.
2. Deberían existir diferencias en los niveles plasmáticos de MMP-9 de pacientes con diferentes estadios clínicos de carcinoma prostático.
3. Deberían existir diferencias en los niveles plasmáticos de MMP-9 que presentan pacientes con diferentes grados anatomopatológicos de carcinoma prostático.
4. La medida y el estudio de los niveles de MMP-9 pueden complementar al PSA como instrumento de diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata.

2.2. Objetivos

1. Determinar las diferencias en los niveles plasmáticos de MMP-9 entre pacientes sometidos a una biopsia prostática con resultado positivo para tumor y aquellos en los que la histología sea benigna.
2. Determinar si los niveles de MMP-9 en plasma se relacionan con el riesgo de padecer un carcinoma prostático.
3. Determinar si los niveles de MMP-9 en plasma guardan relación con el grado y el estadio tumoral.
4. Determinar si los niveles de MMP-9 en plasma guardan relación con el pronóstico del carcinoma prostático.

3. Material y métodos

3.1. Recogida de datos

El estudio fue diseñado como una cohorte de base hospitalaria. Los pacientes incluidos eran sospechosos (por los diferentes métodos de los que se dispone en este momento) de ser portadores de un carcinoma prostático y se sometieron a una biopsia de próstata en el Servicio de Urología del Hospital de Cabueñes desde agosto del año 2006 a noviembre del año 2008. Para incluir un paciente en el estudio debía cumplirse al menos uno de los siguientes criterios de inclusión:

1. PSA sérico superior a 4 ng/ml.
2. Tacto rectal sospechoso de tumor prostático.
3. Imagen sospechosa de neoplasia prostática en ecografía transrectal.

Se excluyó a los pacientes que:

1. Denegaron su consentimiento a participar en el estudio
2. Presentaron un diagnóstico previo de enfermedad neoplásica prostática o no prostática.
3. Padeían enfermedades inflamatorias agudas o crónicas que pudiesen alterar de manera significativa el nivel de metaloproteasa 9.
4. Hayan sido tratados en los 6 meses previos con fármacos que alteren el nivel de PSA: estrógenos, antiandrógenos, corticoides, análogos de la LH-RH o inhibidores de la 5- α reductasa.

En primer lugar la razón, el objeto y la metodología del estudio fueron explicados detenidamente a cada paciente, tras lo cual éste leyó y firmó un consentimiento informado revisado y aprobado por el Comité Ético Regional.

En segundo lugar, durante la misma entrevista, fue realizada una historia clínica elemental por varios urólogos con experiencia y metodología protocolizada haciendo hincapié en los aspectos relevantes para el estudio.

3.2. Las muestras

La biopsia transrectal se realizó por varios urólogos con experiencia en el procedimiento, con la recogida de cilindros de tejido con agujas “tru-cut” 18 gauge guiada por un ecógrafo Siemens SONOLINE SI 250 y una sonda para ecografía transrectal de 7 MHz. La posición del paciente fue de decúbito lateral izquierdo en genupectoral, siempre bajo profilaxis antibiótica con ciprofloxacino y previo enema de limpieza.

Se recogieron mediante venopunción entre 10-20 ml de sangre de cada participante en tubos Vacutainer que contenían EDTA K3E como anticoagulante. En todos los casos la recogida de sangre se produjo antes de la realización de la biopsia. Las muestras fueron procesadas para separar el plasma de las células sanguíneas, mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 min, en las 2-6 horas posteriores a su extracción durante las cuales se mantuvieron a una temperatura de 4°C. Posteriormente, las muestras de plasma y células sanguíneas fueron debidamente etiquetadas y congeladas a -40°C.

La medición de los niveles de PSA en suero se realizó en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital de Cabueñes según la técnica estándar mediante el método de quimioluminiscencia en un analizador Advia Centaur de Siemens, utilizando el reactivo Advia Centaur PSA. Ready Pack de Bayer.

La determinación de los niveles plasmáticos de MMP-9 fue realizada por personal especializado en el laboratorio de la unidad de Epidemiología Molecular del Cáncer del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA) de la Universidad de Oviedo (<http://www.unioviedo.es/Oncologia/>), mediante la técnica de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), ensayo inmunoenzimático basado en la especificidad del reconocimiento antígeno-anticuerpo. Esta técnica indirecta, cuantifica la cantidad de anticuerpos

unidos a la molécula estudiada en una muestra. Un anticuerpo monoclonal específico de la MMP-9 prefijado a una microplaca inmoviliza la MMP-9 que contenga el suero. Tras un lavado que retire las sustancias no fijadas por este anticuerpo, otro anticuerpo policlonal también específico de la MMP-9 ligado a un enzima se vierte sobre la muestra. Tras un nuevo lavado para eliminar los restos de este nuevo anticuerpo no fijado, se añade una solución con sustrato, produciendo una cantidad de color medible y proporcional a la cantidad total de MMP-9 unida en el primer paso. La valoración final de la cantidad de MMP9 es detectada espectrofotográficamente con un lector ELISA. La firma suministradora del kit comercial para la realización del ELISA fue R&D Systems, Inc.

3.3. Análisis de los resultados

El análisis estadístico fue realizado por personal especializado de la Unidad de Epidemiología molecular del Instituto Asturiano de Oncología de la Universidad de Oviedo.

Para la descripción de variables continuas se emplearon estadísticos descriptivos como media, mediana, desviación típica, mínimo, máximo y percentiles.

Para la comparación de variables continuas según diferentes grupos de individuos se emplearon el test t para la igualdad de medias en caso de normalidad y el test no paramétrico de Kruskal-Wallis cuando no se cumplía el supuesto de normalidad. Se consideró la existencia de diferencias estadísticamente significativas cuando el valor resultante en un contraste (p-valor) fue menor que 0,05

El estudio de correlación entre la expresión de PSA y la expresión de MMP-9 se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (admitiéndose correlación entre las variables para coeficientes menores de -0,7 o mayores de 0,7).

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa Stata/SE 8.2 para Windows. (SPSS, Chicago, IL, USA).

4. Resultados

En el estudio fueron incluidos 282 pacientes con una media de edad de 64.4 años (48-80 años), y con un valor medio de PSA de 15.40 (Tabla 1).

N	Media	Desv. Típ	Mín.	P 25%	P 50%	P 75%	Máx.
282	15.40	32.68	0.40	6	8.05	11.9	299

Tabla 1. Distribución del PSA.

Se realizó una biopsia de próstata a todos ellos con una media de 8.4 cilindros por paciente (de 3 a 20 cilindros). 155 pacientes obtuvieron una histología benigna, 118 fueron diagnosticados de adenocarcinoma prostático y 9 obtuvieron otras histologías (neoplasia prostática intraepitelial o focos microscópicos de adenocarcinoma).

De 118 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma prostático, 4 tuvieron un Gleason 4, 2 un Gleason 5, 54 Gleason 6, 36 Gleason 7, 18 Gleason 8 y 4 Gleason 9.

El estadio clínico se distribuyó de la siguiente manera: En el estadio local T 45 pacientes fueron asignados a T1, 61 como T2, 10 como T3 y 1 como T4. El estadio regional N se distribuyó en N0 33 pacientes, N1 7 pacientes y Nx 74 pacientes. La medida del estadio M obtuvo 30 pacientes con M0, 10 pacientes con M1 y 73 pacientes con Mx. De entre los pacientes en los que el estadio no fue evaluable hay 43 pacientes que podrían considerarse como carcinomas localizados, al cumplir que T fue menor o igual a 2, el PSA menor o igual a 20 y el Gleason de la biopsia menor de 7.

Fueron encontrados resultados estadísticamente significativos entre la expresión de PSA previo a la biopsia y el resultado de ésta, tanto comparando los pacientes con tumor a los pacientes sin tumor con $p=0.0001$, como incluyendo el grupo de histologías inciertas con $p=0.0003$. (Tabla 2 y Figura 1).

Tumor/ PSA	N	Media	D. T.	Mín	P 50%	Máx	Kruskall – Wallis p-valor	
No tumor	155	8.64	4.93	0.40	7.40	38.20	0.0001	0.0003
Tumor	118	24.76	48.79	0.60	9.55	299		
Otros	9	9.20	3.19	4.50	8.60	14.80		

Tabla 2. Distribución del PSA según la presencia de tumor.

Se encuentran asimismo diferencias significativas entre los resultados del cociente de PSA libre entre PSA total (PSA l/t) entre los pacientes con tumor, los que no lo tienen y los del grupo de otros hallazgos histológicos, con $p=0.0002$, como se muestra en la tabla 3:

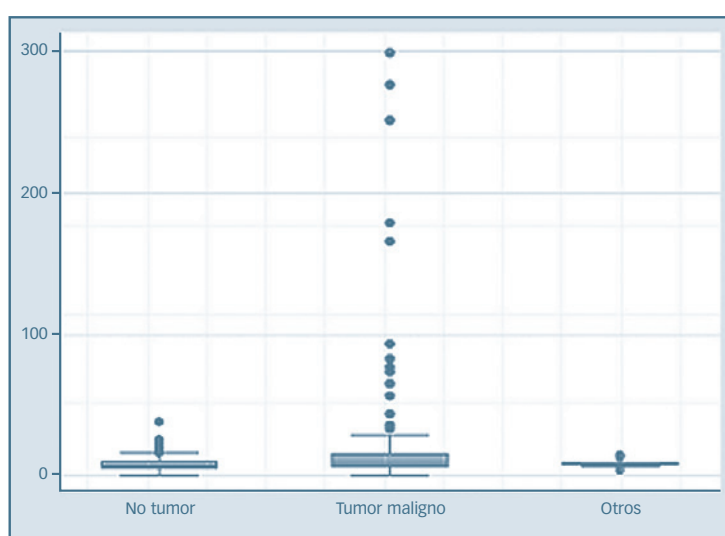


Figura 1. Distribución del PSA según histología de la biopsia.

Tumor	N	Media	D. T.	Mín	P 50%	Máx	Kruskall – Wallis p-valor	
No tumor	110	14	6.43	3.50	13.05	50.60	0.0001	0.0002
Tumor	74	10.62	4.86	2.80	9.65	22.80		
Otros	6	13.13	4.03	8.70	12.45	20.60		

Tabla 3. Cociente de PSA l/t según la presencia de tumor.

La distribución del PSA también muestra diferencias significativas cuando se comparan los pacientes con diferentes grados de Gleason en la muestra de Biopsia $p=0.0034$, tal como se muestra en la tabla 4.

Gleason /PSA	N	Media	Desv. Típ.	Mín.	P 50%	Máx.	Kruskall –Wallis p-valor
4	4	7.98	3.89	5.90	6.10	13.80	0.0034
5	2	21.20	11.17	13.30	21.20	29.10	
6	54	12.49	21.89	0.60	8.40	165.50	
7	36	28.67	60.06	2.70	10.45	276.80	
8	18	58.39	74.86	5.90	29.15	299	
9	4	22.58	19.95	4.80	20.75	44	

Tabla 4. Distribución de PSA según el Gleason de la Biopsia.

Esta diferencia significativa ($p=0.0088$) se mantuvo agrupando los grados Gleason en las categorías usadas en la práctica clínica: Gleason bajo de 2 a 4, Gleason medio 5 y 6 y Gleason alto 7, 8 y 9. Tabla 5. Figura 2.

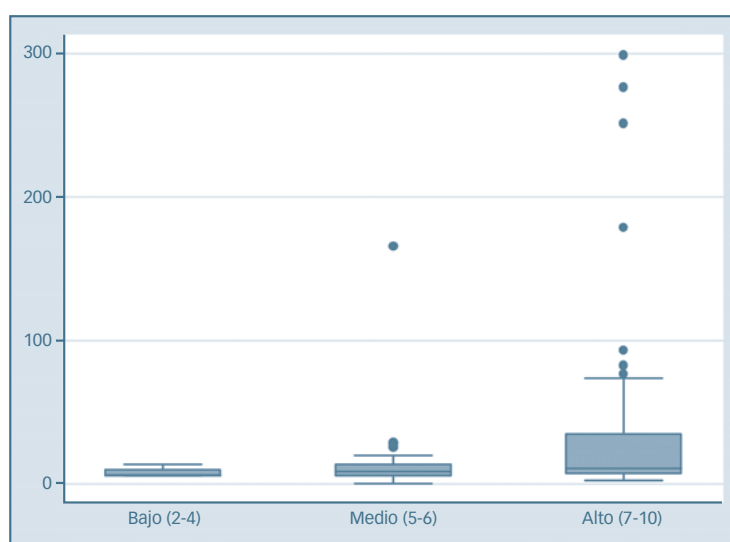


Figura 2. Distribución del PSA según el grado Gleason.

Gleason/PSA	N	Media	Desv. Típ.	Mín.	P 50%	Máx.	Kruskall –Wallis p-valor
Bajo (2-4)	4	7.98	3.89	5.90	6.10	13.80	0.0088
Medio (5-6)	56	12.80	21.60	0.60	8.70	165.50	
Alto (7-8)	58	37.47	64.11	2.70	10.90	299	

Tabla 5. Distribución del PSA según categorías histológicas.

En cuanto a la distribución de PSA en los pacientes según los estadios clínicos se encontraron diferencias en los pacientes según el estadio clínico local T, con $p=0.0012$, Tabla 6, Figura 3.

Estadio	N	Media	Desv. Típ.	Mín.	P 25%	P 50%	P 75%	Máx.	Kruskall –Wallis p-valor
T1	45	10	4.99	4.10	5.90	8.60	13.30	28.30	0.0012
T2	61	30.53	62.38	0.60	6.50	9.60	14.30	299	
T3	10	53.91	48.93	6	29.10	39.55	64.60	178.80	
T4	1	65.40							

Tabla 6. Distribución del PSA según el estadio T.

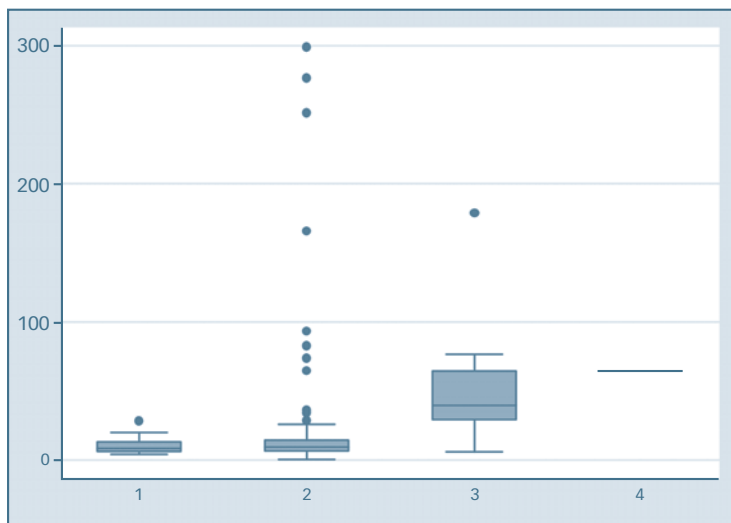


Figura 3. Distribución del PSA según el estadio T.

Se encontraron diferencias en la distribución del PSA entre los pacientes con distinto estadio clínico N, con $p=0.0001$, Tabla 7, Figura 4.

También fueron encontradas diferencias significativas en los niveles de PSA al agrupar los pacientes

Estadio	N	Media	Desv. Típ.	Mín.	P 50%	Máx.	Kruskall – Wallis p-valor
N0	33	20.76	28.01	4.80	14.30	165.50	0.0001
N1	7	76.43	50.28	11	65.40	178.80	
Nx	74	21.92	54.59	0.60	7.90	299	

Tabla 7. Distribución de PSA según el estadio clínico N.

según el estadio clínico M, con $p=0.0001$, En cuanto a la expresión de Metaloproteasa de Matriz 9 (MMP-9), se obtuvieron datos de 248 pacientes, con valores desde 0 ng/ml (-142.90) hasta 2001.1 ng/ml, como se expone en la Tabla 8. Figura 5.

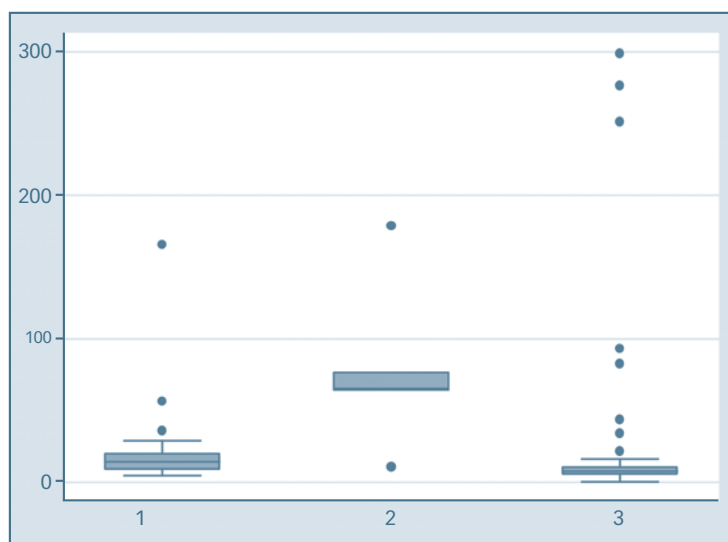


Figura 4. Distribución del PSA según estadio N.

Estadio	N	Media	Desv. Típ.	Mín.	P 50%	Máx.	Kruskall –Wallis p-valor
M0	30	16.34	10.98	4.80	13.55	56.50	0.0001
M1	10	125.49	93.50	15	75.3	299	
Mx	73	14.87	34.26	0.60	7.90	276.80	

Tabla 8. Distribución de PSA según el estadio M.

En cuanto a la expresión de Metaloproteasa de Matriz 9 (MMP-9), se obtuvieron datos de 248 pacientes, con valores desde 0 ng/ml (-142.90) hasta 2001.1 ng/ml, como se expone en la Tabla 9 y Figura 6.

Agrupando a los pacientes según el resultado de la biopsia en pacientes con tumor maligno, pacientes

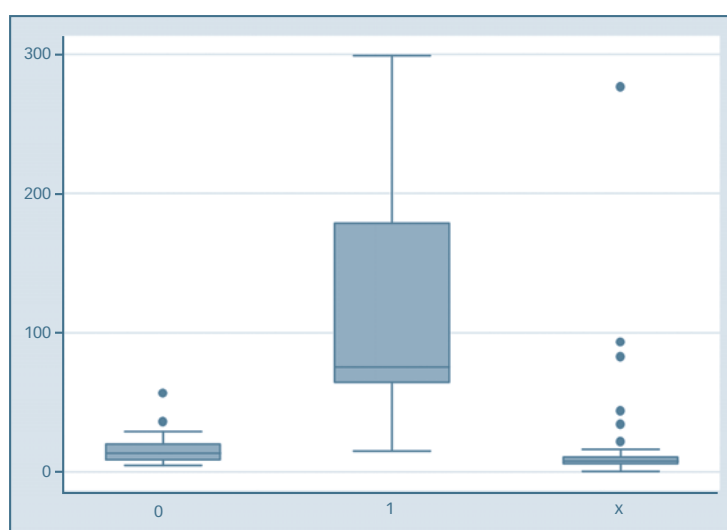


Figura 5. Distribución de PSA según estadio M.

N	Media	Desv. Típ.	Mín.	P 25%	P 50%	P 75%	Máx.
248	487.89	446.92	-142.90	152.40	354.10	700.10	2001.10

Tabla 9. Distribución de MMP-9 en la muestra.

con histología benigna, y pacientes con histología indeterminada se obtuvieron grupos de 97, 143 y 8 sujetos respectivamente, sin que se observasen diferencias estadísticas entre la expresión plasmática de MMP-9 de cada grupo, tanto al comparar los pacientes con tumor a los pacientes sin tumor

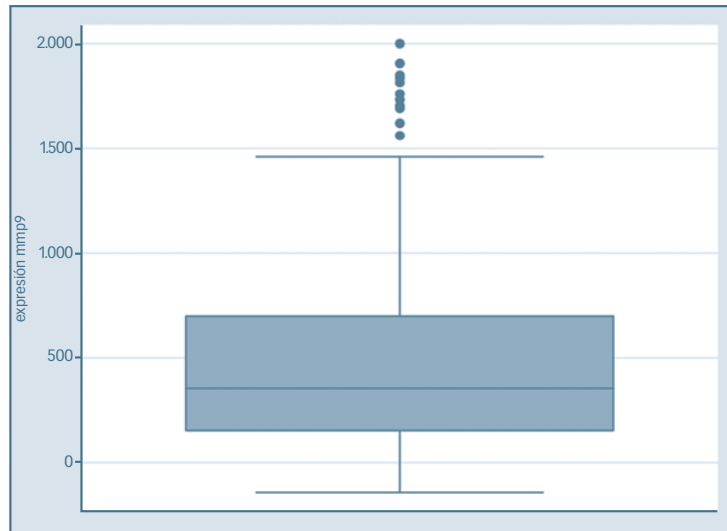


Figura 6. Expresión de MMP-9 en la muestra.

($p=1.000$), como al comparar los tres grupos simultáneamente ($p=0.683$). Se muestra en la tabla 10 y en la figura 7 en nanogramos por mililitro.

Tumor/ MMP-9	N	Media	D. T.	Mín	P 25%	P 50%	P 75%	Máx	Kruskall-Wallis p-valor
No tumor	143	476.67	422.52	-6	146.20	355.90	710.70	1849.80	1.000 0.6883
Tumor	97	498.88	485.86	-142.90	151.10	348.60	679.70	2001.10	
Otros	8	555.34	423.69	198.90	240.50	434.45	721.90	1450.10	

Tabla 10. Expresión de MMP-9 en ng/ml según el resultado de la biopsia

Para realizar un análisis de subgrupos la muestra fue dividida en función del PSA, de tal manera que los pacientes fueron agrupados en aquellos con PSA normal (menor o igual a 4ng/ml), PSA de rango dudosamente patológico (de 4 a 10 ng/ml) y claramente patológico (mayor de 10 ng/ml).

El grupo de pacientes con PSA normal incluyó 9 pacientes, de los cuales 2 presentaron un diagnóstico de adenocarcinoma prostático y 7 presentaron una biopsia sin tumor. No hubo diferencias estadísticas en la expresión

Tumor/MMP-9	N	Media	D. T.	Mín	P 50%	Máx	Kruskall-Wallis p-valor
No tumor	7	400.42	394.30	33.90	338.20	1184.40	0.5582
Tumor	2	157	37.05	130.80	157	183.20	

Tabla 11. Expresión de MMP-9 en ng/ml en pacientes con PSA \leq 4.

de MMP-9 entre ambos (p=0.5882), tal como se muestra en nanogramos por mililitro en la tabla 11 y en la figura 8.

El segundo subgrupo, con pacientes con PSA de 4 a 10 ng/ml, obtuvo 157 pacientes, de los cuales 50 fueron positivos para tumor, 100 no lo tenían y en 7 casos se presentaron histologías dudosas. No se observaron diferencias entre la expresión de MMP-9 entre los grupos tumor y benigno (p=0.4841), ni comparando los tres grupos entre sí, Tabla 12. Figura 9.

En el grupo de pacientes con PSA claramente patológico (PSA>10ng/ml)

se obtuvo determinación de la MMP-9 plasmática en 82 pacientes, de los cuales 45 presentaron un tumor maligno, 36 no lo presentaron y 1 paciente presentó una histología premaligna (Neoplasia prostática intraepitelial de alto grado). No se encontraron diferencias estadísticas en la expresión

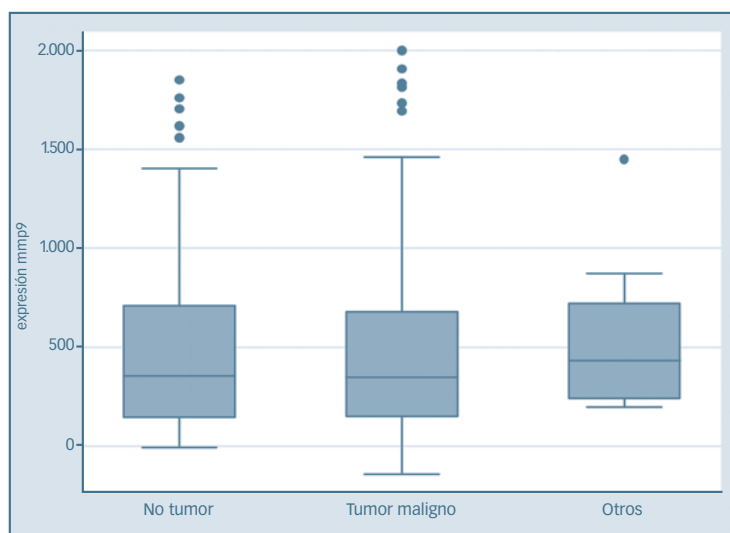


Figura 7. Expresión de MMP-9 en ng/ml según el resultado de la biopsia.

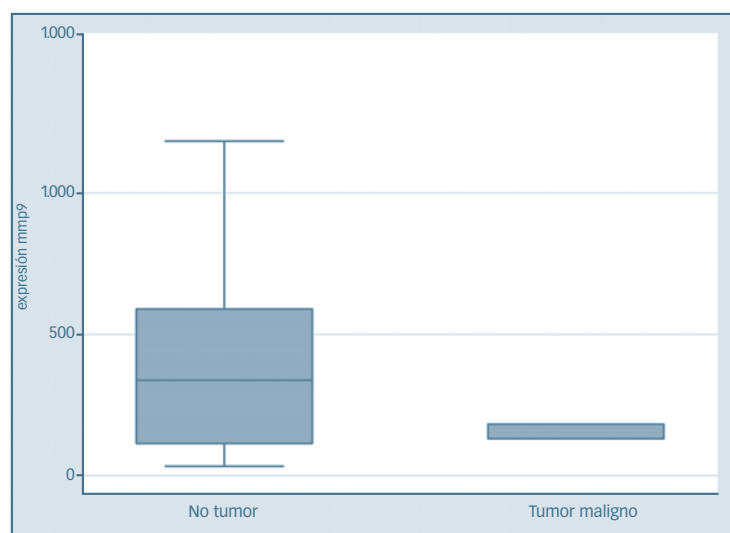


Figura 8. Expresión de MMP-9 en ng/ml en pacientes con PSA \leq 4.

Tumor/MMP-9	N	Media	Des. Típ.	Mín	P 50%	Máx	Kruskall–Wallis p-valor	
No tumor	100	489.59	429.08	-6	355.90	1849.80	0.4841	0.6924
Tumor	50	464.52	455.81	-67.10	352.80	1733.20		
Otros	7	510.17	436.34	198.90	411.90	1450.10		

Tabla 12. Expresión de MMP-9 en ng/ml en pacientes con PSA 4-10 ng/ml.

de MMP-9 entre los tres grupos ($p=0.3833$) ni comparando los pacientes con carcinoma prostático frente a los pacientes sin él ($p=0.3923$). Se resume en la tabla 13 y en la figura 10.

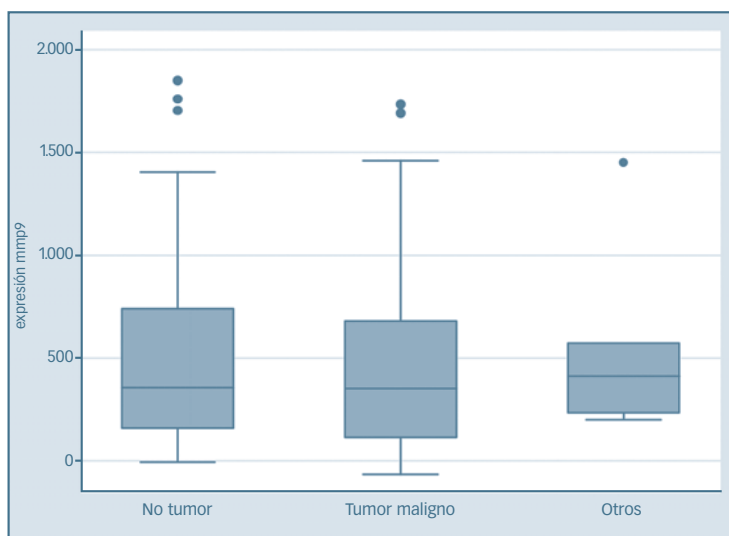


Figura 9. Expresión de MMP-9 en pacientes con PSA 4-10 ng/ml.

Tumor/MMP-9	N	Media	D. T.	Mín	P 50%	Máx	Kruskall–Wallis p-valor	
No tumor	36	455.58	418.07	32.20	344.60	1619.10	0.3923	0.3833
Tumor	45	552.26	523.51	-142.90	348.60	2001.10		
Otros	1	871.50						

Tabla 13. Expresión de MMP-9 en pacientes con PSA >10.

Utilizando el cociente de PSA libre entre PSA total (PSA l/t) se realizó un análisis por subgrupos de expresión de la MMP-9. Se realizó un análisis de los pacientes con PSA l/t anormal (en este caso menor o igual al 15%), sin encontrar diferencias estadísticas entre los pacientes con tumor prostático, los pacientes sin tumor y los pacientes con histología indeterminada,

tanto en la comparación de los tres grupos, con $p=0.3626$, como en la comparación del grupo con tumor frente al grupo sin tumor en la biopsia, con $p=0.8774$, se muestra en la tabla 14 y en la figura 11.

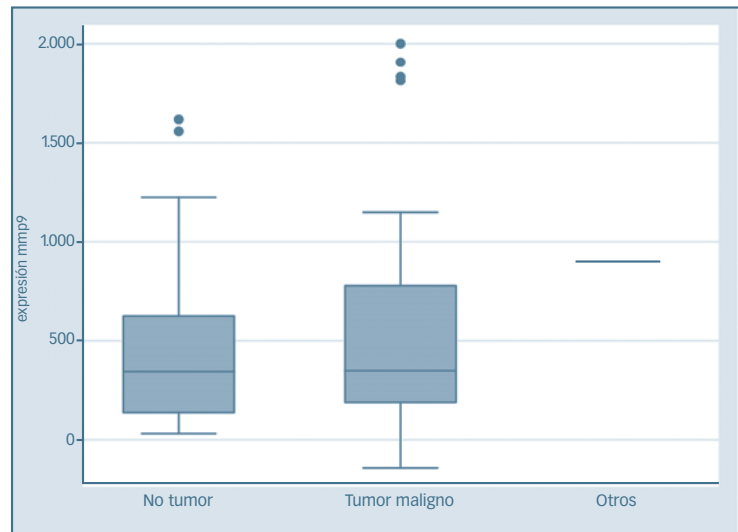


Figura 10. Expresión de MMP-9 en ng/ml en pacientes con PSA >10ng/ml.

Tumor/MMP-9	N	Media	D. T.	Mín	P 50%	Máx	Kruskal-Wallis p-valor	
No tumor	92	477.18	407.68	4	358.85	1849.80	0.8774	0.3626
Tumor	57	498.06	472.06	-142.90	355.60	1811.30		
Otros	4	786	510.29	250.10	721.90	1450.10		

Tabla 14. Expresión de MMP-9 en pacientes con PSA l/t ≤15%.

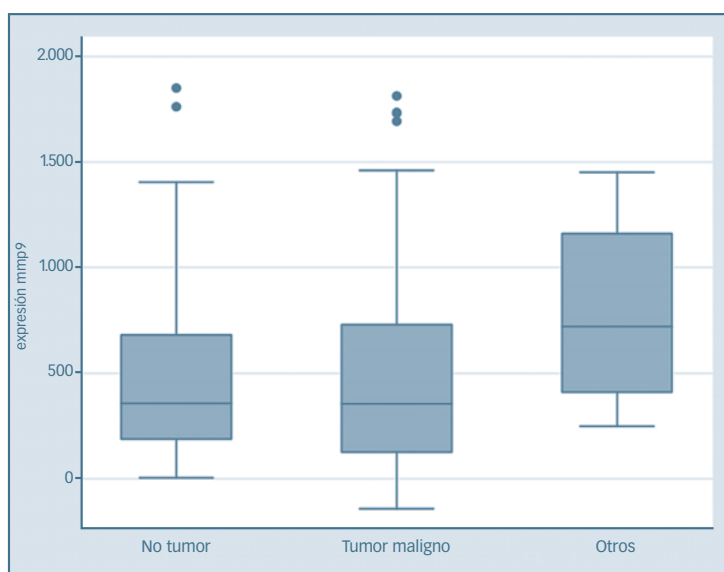


Figura 11. Expresión de MMP-9 en pacientes con PSA l/t ≤15%.

En el subgrupo de pacientes con PSA l/t mayor del 15% tampoco se encontraron diferencias estadísticas en la expresión de MMP-9 entre los pacientes con cáncer de próstata y los pacientes sin cáncer con $p= 0,7773$, y con $p= 0,9301$ al incluir en el estudio a los pacientes con histologías indeterminadas. Se muestra en la tabla 15 y en la figura 12.

Tumor/MMP-9	N	Media	D. T.	Mín	P 50%	Máx	Kruskall–Wallis p-valor	
No tumor	10	544.53	501.87	109.60	375.75	1619.10	0.7773	0.9301
Tumor	4	439.90	226.82	186.70	453.95	665		
Otros	1	457						

Tabla 15. Expresión de MMP-9 en pacientes con PSA l/t>15.

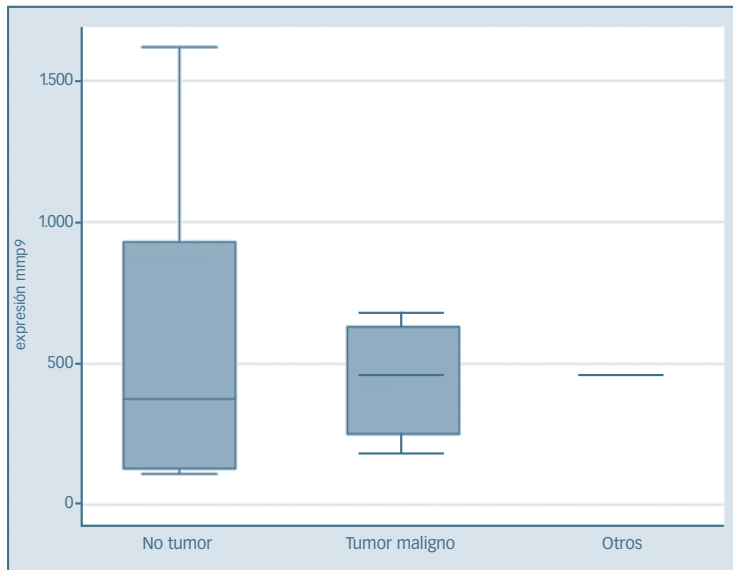


Figura 12. Expresión de MMP-9 en pacientes con PSA l/t>15%.

Se realizó un estudio sobre la distribución de metaloproteasa 9 en los pacientes con hallazgo de adenocarcinoma prostático en la biopsia, estudiando las diferencias en función del grado Gleason. Se obtuvieron datos de 97 pacientes de entre los cuales 4 fueron Gleason 4, 2 pacientes fueron Gleason 5, 47 pacientes fueron Gleason 6, 27 pacientes fueron Gleason 7, 14 pacientes fueron Gleason 8 y 2 pacientes fueron Gleason 9. Los valores de MMP-9 oscilaron entre 0 (-142.90) y 2001.10, sin manifestarse diferencias estadísticas entre diferentes grados de Gleason ($p=0.7676$).

Gleason/MMP-9	N	Media	Desv. Típ.	Mín.	P 50%	Máx.	Kruskall –Wallis p-valor
4	4	672.05	304.11	238.20	751.30	947.40	0.7676
5	2	484	416.20	189.70	484	778.30	
6	47	527.62	526.85	-67.10	379.50	2001.10	
7	28	408.07	413.97	-142.90	330.20	1905.40	
8	14	515.21	524.67	137.70	298.15	1834.40	
9	2	649.25	893.43	17.50	649.25	1281	

Tabla 16. Expresión de MMP-9 en ng/ml en función del Grado Gleason.

Agrupando los grados Gleason en bajo (2, 3 y 4), medio (5 y 6) y alto (7, 8 y 9) tampoco hubo diferencias de expresión de MMP-9 ($p=0.3670$). Se muestra en la *tabla 16* y en las *figuras 13* y *14*.

Se estudió la relación entre la expresión plasmática de metaloproteasa-9 y los estadios clínicos local (T), ganglionar (N) y metastático (M). En cuanto al estadio local del tumor, se obtuvieron datos de 96 pacientes, de los cuales 39 fueron clasificados como T1, 48 fueron clasificados como T2, 8 fueron clasificados como T3 y 1 como T4. La expresión plasmática de MMP-9 osciló entre 0

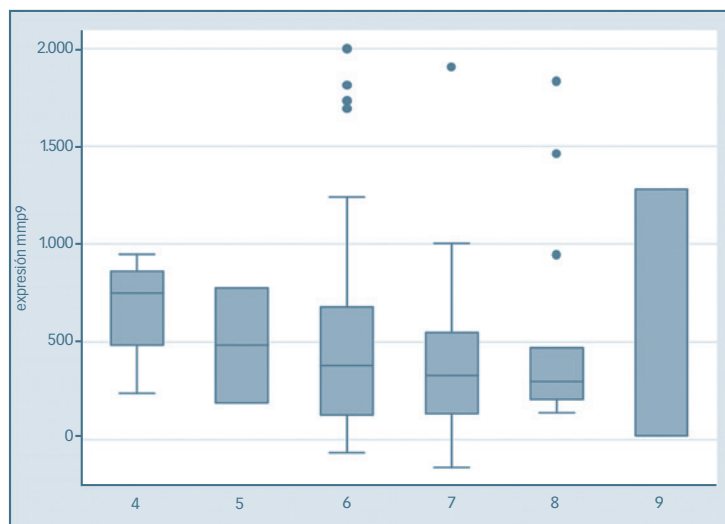


Figura 13. Expresión de MMP-9 según el Gleason de la biopsia.

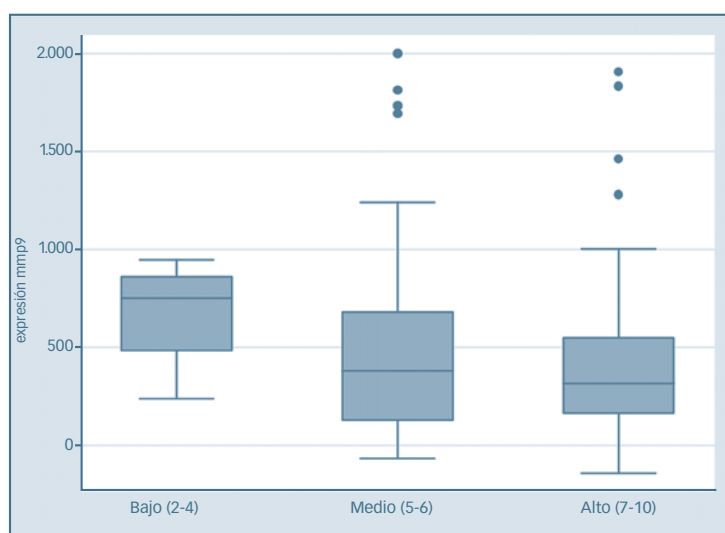


Figura 14. Expresión de MMP-9 según el grado Gleason (agrupados).

(-142.90) y 2001.10, sin observarse diferencias estadísticas entre los distintos estadios ($p=0.3408$), tal como se muestra en la *tabla 17* y en la *figura 15*.

Estadio/MMP-9	N	Media	Desv. Típ.	Mín.	P 50%	Máx.	Kruskall –Wallis p-valor
T1	39	550.07	523.32	-142.90	379.50	2001.10	0.3408
T2	48	416.86	425.25	-67.10	316.60	1905.40	
T3	8	758.24	625.27	151.10	628.45	1834.40	
T4	1	279.40					

Tabla 17. Expresión de MMP-9 en ng/ml en función del estadio local T.

En el estudio de la expresión de metaloproteasa 9 en función del estadio ganglionar N se obtuvieron datos de 34 pacientes, de los cuales 29 no tenían afectación ganglionar (N0), y 5 sí la tuvieron (N1). Los valores de MMP-9 oscilaron entre 0 (-67.10) y 1905.40. No fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas en la expresión de metaloproteasa 9 entre ambos grupos con una $p=0.6116$. Se resume en la tabla 18 y en la figura 16.

El estudio de la expresión de la metaloproteasa 9 en función del estadio metastático M obtuvo datos de 35 pacientes, de los cuales en 8 se confirmó la afectación ósea (M1),

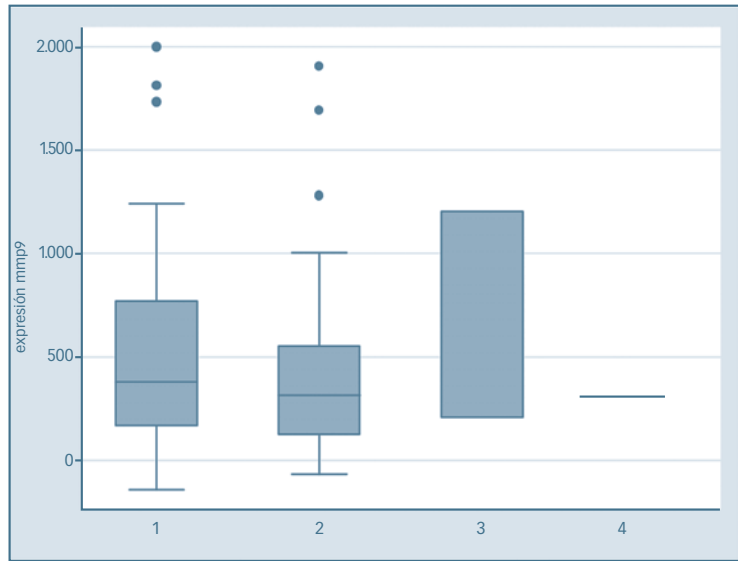


Figura 15. Expresión de MMP-9 es función del estadio T.

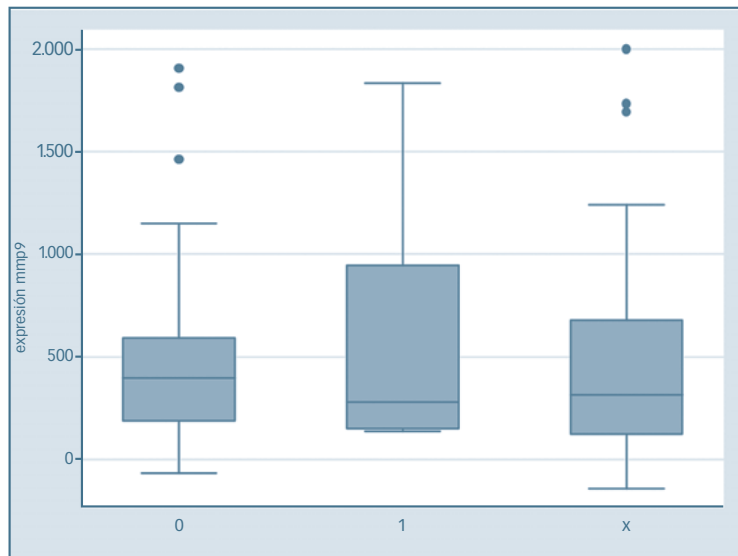


Figura 16. Expresión de MMP-9 en función del estadio N.

Estadio/MMP-9	N	Media	Desv. Típ.	Mín.	P 50%	Máx.	Kruskall –Wallis p-valor
N0	29	531.11	504.23	-67.10	399.40	1905.40	0.6116
N1	5	669.42	730.81	137.70	279.40	1834.40	
Nx	60	459.42	459.11	-142.90	315.45	2001.10	

Tabla 18. Expresión de MMP-9 en ng/ml en función del estadio N.

Estadio/MMP-9	N	Media	Desv. Típ.	Mín.	P 50%	Máx.	Kruskall –Wallis p-valor
M0	27	545.19	519.06	-67.10	399.40	1905.40	0.7229
M1	8	526.48	594.81	70.90	264.45	1834.40	
Mx	58	469.74	463.30	-142.90	318.05	2001.10	

Tabla 19. Expresión de MMP-9 en ng/ml en función del estadio M.

y en 27 casos el estudio fue negativo (M0). La expresión plasmática de metaloproteasa osciló entre 0 (-142.90) y 1905.4, sin observarse diferencias en la expresión de metaloproteasa 9 entre ambos grupos ($p=0.7229$). Se explica en la Tabla 19 y Figura 17.

Finalmente fueron realizados dos estudios de correlación logística. El primero estudió la relación entre los valores de expresión plasmática de metaloproteasa 9 y los valores de PSA sérico. Se obtuvieron datos de 248 pacientes, observando un coeficiente de correlación de Pearson de 0.0286, lo que descarta relación entre la expresión de ambas proteínas, como se expresa gráficamente en la figura 18.

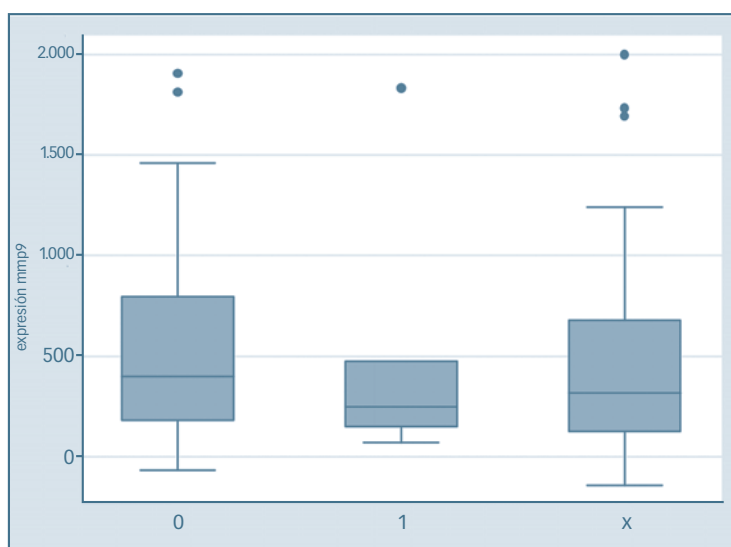


Figura 17. Expresión de MMP-9 en función del estadio M.

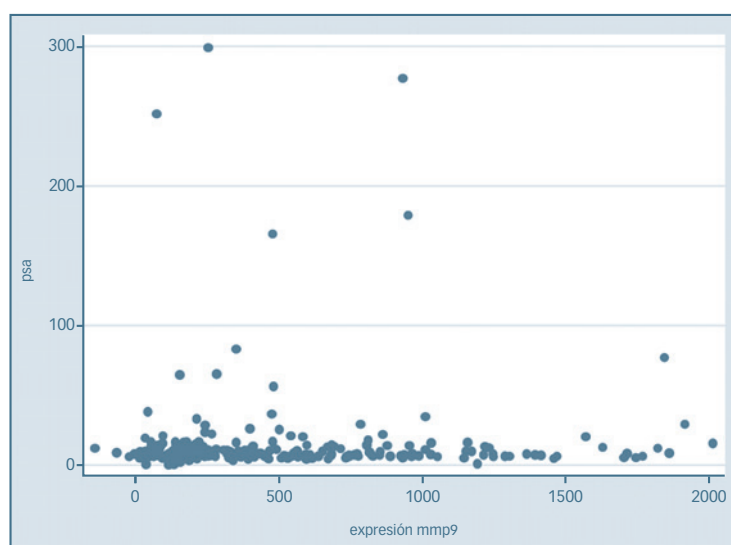


Figura 18. Correlación entre PSA y MMP-9, ambos en ng/ml.

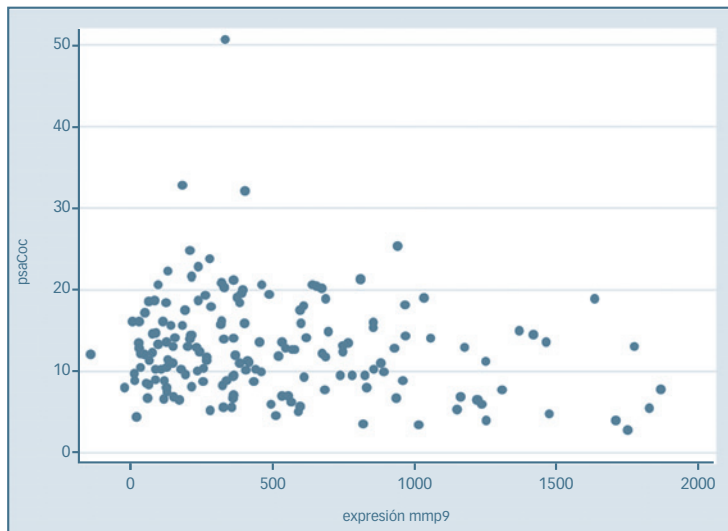


Figura 19. Correlación entre PSAI/t y expresión de MMP-9.

El segundo estudio de correlación se realizó relacionando el cociente de PSA libre entre PSA total (PSAI/t) y la expresión de metaloproteasa 9. Se obtuvieron datos de 168 pacientes, con un índice de correlación de Pearson $p=-0.1869$, lo que descarta relación lineal entre ambos parámetros. Se presenta en la [Figura 19](#).

5. Discusión

5.1. Los objetivos del estudio: diagnóstico y pronóstico

El primer objetivo del presente trabajo fue la exploración de un nuevo marcador potencial del Cáncer de Próstata que ayudase a discriminar a aquellos pacientes realmente sospechosos de ser portadores de un tumor maligno en el contexto de una elevación del PSA sérico.

La generalización del uso del PSA como prueba de “screening” ha supuesto un incremento progresivo de la incidencia del Cáncer Prostático a expensas de diagnósticos en pacientes más jóvenes y estadios más precoces (Granado de la Orden S. 2006). En este contexto tiende a producirse un descenso de la tasa de mortalidad asociada al tumor, pero probablemente también un exceso en el diagnóstico de tumores clínicamente no significativos con el incremento de tratamientos radicales de intención curativa que ello supone (Carter 2004).

De igual manera ha supuesto un incremento paralelo pero mucho menos estudiado en el número de biopsias prostáticas. La realización de una biopsia prostática no produce una morbilidad y mortalidad tan importantes como el tratamiento radical, pero tampoco está exenta de problemas y complicaciones. La mayoría de los pacientes presentan dolor, más del 60% de las biopsias prostáticas da lugar a alguna complicación leve, e incluso es necesaria la hospitalización en aproximadamente el 1%. La mortalidad secundaria a este procedimiento es muy escasa pero existe (Rodríguez LV 1998).

Pero un problema no medido es el enorme sufrimiento psicológico innecesario al que se ven expuestos aproximadamente el 60% de los pacientes en los que se indica la biopsia y realmente no la necesitan, pues la sospecha de padecer un cáncer no queda totalmente despejada a pesar del resultado negativo. La ansiedad les acompaña durante años produciendo no solo un decremento de la calidad de vida sino también aumentando la demanda de nuevas consultas,

determinaciones de PSA frecuentes y, ocasionalmente, nuevas biopsias. Este fenómeno es bien conocido por los clínicos que incluso le han dado un nombre: “PSAitis”.

Actualmente se están solicitando en el área sanitaria 5 de Asturias (Gijón y alrededores) más de 12.000 determinaciones anuales de PSA, con casi el 60% de las peticiones provenientes de Atención Primaria y alrededor del 34% desde las consultas de Urología. Aproximadamente en un 20 % de éstas últimas, la analítica es seguida de una biopsia, y de ellas aproximadamente el 36,5 % ofrece un resultado positivo (Cepeda Piorno J. 2005). Son cifras muy importantes a las que se presta una escasa atención, especialmente si la comparamos con la enorme cantidad de estudios que se han realizado acerca de otras etapas de esta misma patología.

Existen tres formas de “screening” diagnóstico en el cáncer de próstata. El hallazgo de una lesión nodular prostática palpable mediante un tacto rectal fue la primera y más sencilla. Plantea tres problemas, en primer lugar tiene una importante dependencia del clínico explorador, lo que la hace difícilmente reproducible; en segundo lugar impide el diagnóstico de tumores de pequeño tamaño o localizados en zonas no evaluables (lo que impide el diagnóstico durante las etapas tempranas de la enfermedad y empeora el pronóstico de la enfermedad); por último existen muchas induraciones prostáticas debidas a focos inflamatorios o calcificaciones que semejan lesiones neoforativas (Gosselaar 2008). Por ello el valor predictivo positivo del tacto rectal anormal para el diagnóstico del carcinoma prostático varía entre el 5 y el 30% (Gustafsson 1992, Catalona 1994).

La segunda forma de diagnóstico de sospecha del cáncer de próstata es la realización de una ecografía transrectal en la que aparezca una lesión hipoecógena. Este método es bastante ineficaz en primer lugar por la dificultad que supone la realización de la prueba de manera extensiva, pero también porque aunque la mayoría de las lesiones tumorales aparecen como hipoecogénicas, existen numerosas presentaciones como lesiones hiperecogénicas o isoecogénicas, provocando hallazgos falsamente negativos en hasta un 40% de los pacientes (Catalona 1994). Por ello no es un método recomendable para el diagnóstico aunque sí tiene su utilidad en la guía de las biopsias transrectales.

Tras la aparición del PSA como método tamiz para el diagnóstico de sospecha del cáncer de próstata el panorama sufrió un cambio radical. Este método se ha demostrado mucho más fiable, aunque no perfecto. Las elevaciones de PSA, especialmente cuando no son llamativas, pueden ser producidas por múltiples factores, a la vez que un número no despreciable de tumores no producen las elevaciones esperadas, lo que retrasa el diagnóstico, como se ha desarrollado en la introducción. Actualmente es el mejor de los métodos existentes, por fiabilidad y sencillez, pero no está exento de problemas. Su valor predictivo positivo sigue siendo escaso, aproximadamente un 25% cuando el PSA es mayor de 4 ng/ml, y de un 50% cuando es mayor de 10 ng/ml (Catalona 1994). Estos valores pueden incrementarse con la medición del PSA libre, como se ha comentado en la introducción, pero de una manera limitada, lo que sigue provocando la realización de un gran número de biopsias innecesarias.

La metaloproteasa de matriz 9 no es un marcador específico de la próstata, pero sí está claramente relacionado con el desarrollo y progresión tumorales, lo que podría discriminar aquellas elevaciones de PSA relacionadas realmente con un problema tumoral. La medida de sus valores de expresión séricos ha demostrado ser útil en el diagnóstico diferencial de masas suprarrenales malignas frente a las benignas no funcionales (Berker 2010), tumores colorrectales en pacientes con sintomatología inespecífica (Hurst 2007) incrementando el valor predictivo positivo de otros marcadores en colon (Wilson 2009) o en vejiga (Monier 2000), entre otros. Existen pocos estudios en relación con el cáncer de próstata, y como ha sido presentado previamente, sus resultados, aunque variables, han sido prometedores en este campo.

El segundo objetivo del estudio fue la medición de los niveles sistémicos de metaloproteasa 9 en pacientes con cáncer como método para la valoración pronóstica. Una vez diagnosticado el tumor prostático es necesaria la toma de decisiones en función de la historia natural de la enfermedad inferida por el clínico. Esta toma de decisiones es en numerosas ocasiones compleja por el heterogéneo pronóstico tumoral, de tal manera que es necesario predecir la agresividad tumoral para elegir de entre las opciones de tratamiento la más adecuada a cada paciente. El estadio clínico, el PSA al diagnóstico, el grado Gleason y la estimación del volumen tumoral

mediante el estudio de la cantidad y porcentaje de cilindros afectados en la biopsia son los parámetros tumorales que permiten tomar esta decisión. Pero su capacidad predictiva es limitada:

- El estadio clínico es una medida grosera que tiende a ser inferior al estadio patológico en la mayoría de estudios, ocurriendo esto en hasta el 60% de los pacientes (Bostwick 1994).
- El grado Gleason también tiende a aumentar en las piezas de prostatectomía con respecto a los hallazgos de la biopsia, especialmente en grados bajos, pero también puede disminuir en el estudio de la pieza quirúrgica (Isariyawongse 2008).
- El PSA se relaciona estrechamente con la extensión extraprostática y con el riesgo de recurrencia tras el tratamiento, aunque lo hace de manera estadística, y pierde efectividad al valorar un caso en concreto (Inman 2008).
- Los hallazgos de la biopsia como el número de cilindros afectados, el porcentaje de afectación de los cilindros o la estimación del volumen tumoral son valores de menor importancia que están supeditados a los primeros.

La metaloproteasa de matriz 9 también ha demostrado ser un interesante marcador pronóstico en múltiples tumores. En el caso de la próstata se ha visto relación con el grado Gleason (Sauer 2004) o con el estadio clínico (Zhang 2004). La importancia de relacionar los niveles séricos de MMP-9 con los factores pronósticos conocidos es el desarrollo de un nuevo marcador pronóstico que marque la agresividad tumoral y por tanto la adecuación en la agresividad del tratamiento propuesto.

5.2. La muestra y el PSA

En el presente estudio se enrolaron 282 pacientes sospechosos de padecer un carcinoma prostático, a los que se iba a realizar una biopsia prostática. El número de pacientes de la muestra fue decidido en base al número de tumores que se esperaba encontrar, según el valor predictivo positivo de la biopsia, con el fin de alcanzar alrededor de 100 pacientes diagnosticados de

tumor, número estimado suficiente para obtener diferencias estadísticas en el estudio, de haberse presentado. Fueron incluidos todos los pacientes que cumplían con los criterios de inclusión, de entre todos los pacientes a los que se iba a practicar el procedimiento por parte de los clínicos del Servicio de Urología del Hospital de Cabueñes desde agosto del año 2006 hasta noviembre del año 2008. Los valores de PSA, el resultado de los tactos rectales y la edad de los pacientes son los habituales en la población sospechosa de padecer un carcinoma prostático y similares en general a los de otros estudios sobre el diagnóstico del carcinoma prostático, lo que favorece la validez externa del estudio.

La biopsia prostática fue realizada por varios clínicos con experiencia en el procedimiento, guiada por ecografía transrectal, obteniendo un número de cilindros por paciente de entre 3 y 20, con una media de 8.4. El número de cilindros tomados por paciente fue ajustado según las recomendaciones de las guías clínicas de la “European Association of Urology”, que hasta su versión de 2008 (año en el que se finalizó la toma de muestras) recomendaban la toma de al menos 6 cilindros. Actualmente las guías de la asociación recomiendan la toma de la menos 10 cilindros o el uso de los nomogramas de Viena. La razón en este ajuste del número de cilindros se debe a que la mayoría de los estudios muestran una mayor tasa de detección de cáncer al aumentar el número de cilindros (Heidenreich 2009). La repercusión del número de tumores detectados en este estudio recae sobre la potencia estadística, que se vería levemente disminuida, aunque con los resultados obtenidos no parece tener importancia, pues mientras el PSA muestra una fuerte relación estadística con los tumores diagnosticados, no cabe duda de la ausencia de relación entre el tumor prostático y la MMP-9. Por otro lado, no afecta a la validez interna del estudio, que se mantiene inalterada al distribuir los errores de manera aleatoria y no producirse sesgos.

Las muestras histológicas fueron evaluadas por personal con experiencia en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital de Cabueñes diagnosticando 118 tumores prostáticos, lo que arroja un valor predictivo positivo del 41.84% para los métodos de “screening” utilizados, un valor esperado según la bibliografía para estas cifras de PSA, como se ha explicado previamente. Nueve pacientes presentaron otros tipos de histología como la

neoplasia prostática intraepitelial de alto grado (PIN) o proliferación atípica de pequeño acino (ASAP). Estos pacientes fueron agrupados en un solo conjunto, tal como se hace en la práctica clínica, pues en ambos casos el riesgo de padecer un carcinoma prostático sincrónico se eleva hasta cerca del 50%, por lo que se recomienda también en ambos casos el seguimiento estrecho o la realización de una nueva biopsia de próstata (Heidenreich 2009).

Los pacientes fueron estratificados según el valor que presentaban de PSA. Al ser una variable continua, el principal problema del PSA es el ajuste de los rangos considerados como normales. Cualquier punto de corte que se proponga tendrá falsos positivos y falsos negativos, por lo que diferentes autores en diferentes medios han desarrollado valores para su uso clínico. De manera clásica el punto de corte de la normalidad se ha establecido en 4 ng/ml, obteniéndose una sensibilidad aproximada del 70-80% y una especificidad del 60-70% (Brawer 1999). Puesto que además de una variable continua es también dinámica, se han establecido rangos ajustados a la edad (Oesterling 1993) o a la raza (Morgan 1993), e incluso varios autores preferentemente americanos, han propuesto el descenso del punto de corte de la normalidad hasta 2.5 ng/ml, con el argumento de evitar la pérdida de diagnósticos, pero a costa de disminuir de manera importante el valor predictivo positivo de la prueba y prácticamente doblar el número de determinaciones consideradas como anormales (Welch 2005). La disminución del punto de corte tiende a producir también el sobrediagnóstico de numerosos tumores no significativos clínicamente (Carter 2004), por lo que su uso es controvertido.

En el presente estudio fueron utilizados los rangos de normalidad en la expresión de PSA clásicos por varias razones. En primer lugar es el más aceptado, aunque por supuesto tiene detractores. En segundo lugar, es el más presente en la literatura, lo que permite comparaciones sencillas en los resultados de diferentes trabajos y en tercer lugar porque es una manera fácil y rápida de estratificar pacientes de manera protocolizada en un grupo de trabajo con varios clínicos.

En cuanto al estadio clínico, fue realizado siguiendo los protocolos de las guías clínicas de la “European Association of Urology”. El estadio T fue evaluado por los clínicos del servicio de Urología del Hospital de Cabueñes mediante tacto rectal y ecografía transrectal en el momento de

realización de la biopsia. Se aportan datos de 117 pacientes, de los cuales algo más del 50% son estadios T2 (es decir, con lesión intraprostática palpable o visible en ecografía transrectal). Esta cifra es algo superior a la aportada generalmente por la literatura, donde la mayoría de los casos suelen ser T1 y puede deberse a la escrupulosa exploración ecográfica a la que se somete a los pacientes en el servicio de Urología del Hospital de Cabueñes, sin poder precisarse cuales de los hallazgos son falsos negativos, por lo heterogéneo del tejido prostático y las limitaciones en la especificidad de la técnica.

La valoración de los ganglios linfáticos pélvicos (estadio N) fue realizada mediante tomografía axial computerizada por radiólogos especialistas en patología urológica del Hospital de Cabueñes, obteniéndose datos de 114 pacientes, de los cuales 74 fueron clasificados como Nx. Se obtuvieron datos de 113 pacientes acerca de la afectación ósea metastática (estadio M) mediante la realización de gammagrafía ósea, de los cuales 73 pacientes fueron clasificados como Mx. Hay un número importante de pacientes no evaluados en cuanto a los estadios N y T. La razón es el escaso número de estudios positivos en pruebas con una sensibilidad limitada, por lo que la “European Association of Urology” sólo recomienda la realización de gammagrafías y tomografías en pacientes que tengan una probabilidad superior al 1% de presentar hallazgos positivos. Esto ocurre en pacientes que presenten PSA > 20 o Gleason 6. Por esta razón 43 pacientes clasificados como Nx Mx podrían ser redistribuidos en el grupo de N0 M0 y no estaría justificada la realización de pruebas de extensión en ellos (Heidenreich 2009).

La relación que se establece entre las cifras de PSA sérico y los hallazgos de la biopsia fue demostrada estadísticamente en la presente muestra, pero observando la figura 1 en el apartado de resultados puede observarse cómo los valores de PSA en los pacientes con tumor maligno se agrupan intensamente en torno a la mediana 9.55 ng/ml, tan solo un nanogramo por mililitro mayor que los pacientes sanos. Este dato abunda en la dificultad para clasificar los pacientes a priori, y la necesidad de un marcador complementario. El cociente de PSA libre entre PSA total fue utilizado de esta manera, aumentando el valor predictivo positivo de la biopsia y evitando la realización de pruebas innecesarias. También fue observada

una diferencia significativa en este parámetro entre los pacientes con tumor y los pacientes sin tumor, pero también de nuevo se observa un importante solapamiento de cifras en función del resultado de la biopsia, producto de su limitado poder diagnóstico. Además es preciso recordar la dificultad en la toma de decisiones diagnósticas frente a un paciente concreto, sin que sea posible aplicar la estadística de un modo riguroso en la práctica clínica.

La capacidad del PSA para establecer una valoración pronóstica fue evaluada mediante la relación guardada con el grado Gleason y el estadio clínico. En cuanto al grado Gleason, existe una relación estadísticamente significativa con el PSA, observando de manera general que los valores asignados a la histología ascienden al ascender el PSA. Comparando las medianas para evitar sesgos debidos a la variabilidad de los pacientes, los valores más altos corresponden al Gleason 8 (percentil 50 = 29.15) y no al Gleason 9 (percentil 50 = 20.75) como cabría esperar. Esto ocurre en ocasiones, pues al disminuir la diferenciación celular (aumentando la agresividad tumoral) disminuye la producción de proteínas específicas como el PSA, lo que impide el diagnóstico de sospecha bioquímico o produce importantes errores pronósticos. Son tumores que no “marcan” PSA, fenómeno especialmente frecuente en estadios muy avanzados de la enfermedad. De nuevo parece necesario un nuevo marcador que permita evaluar estos tumores de baja expresividad bioquímica. Al agrupar los pacientes según el grado Gleason en bajo (2-4), medio (5,6) y alto (7-10) sí se observa una relación lineal entre el Gleason y el PSA, mostrando de nuevo las discrepancias entre los hallazgos estadísticos y la toma de decisiones en la clínica.

La asociación entre el nivel de expresión periférica del PSA y el estadio clínico fue también reflejada en el estudio. Se observa relación estadística entre el estadio T y el PSA, visualmente notoria en la figura 3 del apartado de resultados, pero también se observa en esta figura el solapamiento en las cifras de PSA entre los estadios T2 y T3. Esto tiene una importante consecuencia clínica, pues mientras el estadio T2 es por defecto susceptible de tratamiento radical de intención curativa, en el estadio T3 (tumor fuera de la cápsula prostática) la cirugía o radioterapia radicales están contraindicadas para muchos autores. Esto hace necesario el desarrollo de métodos de estadificación pronóstica más fiables que eviten la toma de decisiones erróneas en la práctica clínica. En el

caso del estadio N, la relación con el PSA alcanza claramente la significación estadística, con $p=0.0001$, pero también es posible intuir la presencia de errores en los datos, pues el grupo N0 incluye un paciente con PSA sérico de 165 ng/ml, dato incompatible con el carcinoma localizado según la literatura médica, lo que de nuevo redonda sobre la escasa sensibilidad de los métodos actuales de estadificación. El estadio M presenta en números la misma relación con el PSA que el estadio N ($p=0.0001$), pero persiste el solapamiento, siendo posible observar pacientes con sospecha de afectación ganglionar con un PSA de tan solo 15 ng/ml, muy cerca del percentil 50 del grupo sin afectación ósea. La revisión crítica de los datos obtenidos muestra por tanto importantes lagunas, vitales por su importancia a la hora de tomar decisiones que marquen la calidad y esperanza de vida futuras del paciente, demostrando la necesidad de desarrollo de nuevos métodos que complementen la sensibilidad y especificidad de los métodos actuales de diagnóstico y pronóstico.

5.3. La Metaloproteasa 9: cuestiones metodológicas

En otros trabajos similares la medición de los niveles de metaloproteasa 9 fue realizada en suero (Vu 2008, Oberg 2000, Ylisirniö 2000, Sauer 2004), en plasma (Ranuncolo 2003, Ishida 2003, Jung 2003, Morgia 2005) o en ambos (Jung 2001, De Cicco 2008). La elección del fluido en el que se mide la cantidad de MMP-9 ha demostrado ser de la mayor importancia a la hora de evaluar los resultados.

La metaloproteasa de matriz 9 está presente en numerosos órganos y tejidos, y la medida de su expresión está influenciada por factores ajenos al objeto de estudio. En el caso del presente trabajo los niveles de metaloproteasa 9 fueron medidos en sangre periférica, existiendo un poderoso factor de confusión que es la presencia de leucocitos y plaquetas. Estas células poseen importantes cantidades de metaloproteasa 9 que se elevan en los procesos inflamatorios (Wielockx 2004, Beck 2008) y se liberan durante la activación plaquetaria favoreciendo la agregación (Sawiki 1997). Por este motivo los procesos inflamatorios forman parte de los criterios de exclusión del estudio; asimismo por este motivo la extracción de la sangre se realizó antes de la realización de la biopsia prostática y también por este motivo la medición de la MMP-9 fue realizada en plasma y no en suero.

Existen múltiples estudios en la literatura que demuestran las variaciones producidas en los niveles medidos de MMP-9 en función de los métodos de extracción y procesamiento de la sangre. Todos los artículos consultados parecen acordar que el suero sanguíneo es un mal sustrato, tanto si lleva factores favorecedores de la coagulación como si no los lleva (Jung 2001, Meissner 2005, Wu 2007, Mannello 2007, Jung 2008). Existe cierto consenso entre autores acerca del uso del citrato como anticoagulante óptimo para el estudio de los niveles plasmáticos de metaloproteasas, de manera genérica (Makowski 2003, Meissner 2005, Jung 2008), si bien ha sido demostrado (Meissner 2005) que los tubos de vidrio con EDTA son óptimos para la determinación de la metaloproteasa 9 al no producirse apenas variaciones en la medida de la MMP-9 cuando se realiza la medición tras distintos periodos de incubación entre la extracción, el centrifugado de la muestra y la congelación del plasma. Por otra parte los autores defensores del citrato no han demostrado diferencias estadísticamente significativas entre el efecto de ambas sustancias (Jung 2008). Por estas razones en el presente estudio se han realizado las mediciones sobre plasma tomado de tubos de vidrio con EDTA como anticoagulante.

Las mediciones de metaloproteasa-9 fueron realizadas mediante la técnica de ELISA (“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”), que es un ensayo inmunoenzimático basado en la especificidad del reconocimiento antígeno-anticuerpo. Esta técnica, indirecta, cuantifica la cantidad de anticuerpos unidos a la molécula estudiada en una muestra. La valoración final de la cantidad de metaloproteasa-9 es detectada espectrofotográficamente con un lector ELISA, el cual mide la cantidad de color producido por un anticuerpo que se une a la MMP-9 fija en la placa. El calibrado de la medición tiene lugar mediante muestras con concentraciones conocidas de MMP-9, asignando el valor “0” de manera protocolizada a una muestra que en teoría no presenta color, y extrapolando posteriormente a las muestras estudiadas los valores conocidos. La presencia de valores negativos en las mediciones de MMP-9 plasmática procede de muestras estudiadas que presentan una menor cantidad de color que las muestras de calibración, y a las que el estudio informático de regresión les aplica estos valores por debajo del “0”. Aunque los

niveles de MMP-9 en estos casos no son obviamente negativos, se ha preferido mantener estos valores con el fin de conservar la máxima rigurosidad del estudio, pero deben ser interpretados simplemente como ausencia de MMP-9.

5.4. La metaloproteasa 9 como marcador diagnóstico

Se obtuvieron datos sobre los niveles de metaloproteasa en 248 pacientes con unos valores que abarcaron desde 0 (-142.9) nanogramos por mililitro a 2001 nanogramos por mililitro, con una media de 487.89 ng/ml y una mediana de 354.10 ng/ml. Estos datos indican una agrupación en valores bajos, con presencia de valores muy altos que desplazan la media, como también es posible ver en la figura 6 del apartado de resultados.

Comparando los datos obtenidos con los estudios previos publicados, se observa cierta heterogeneidad, pues los niveles de Jung son menores (Jung 2001), los de Sauer son equiparables (a pesar de realizar sus mediciones en suero y no en plasma) y los de De Cicco son superiores (De Cicco 2008). Estas diferencias se deben probablemente a los diferentes métodos de medida utilizados y no invalidan los resultados de ninguno de los estudios.

La comparación entre los diferentes grupos de pacientes según el resultado de la biopsia (tumor-no tumor-otras histologías) no mostró diferencias estadísticamente significativas, aún más, el valor p resultante en la comparación de los grupos tumor-no tumor fue 1, lo que muestra una concordancia matemática casi completa. La única diferencia entre ambos grupos es la mayor dispersión de los valores del grupo con cáncer diagnosticado, visible intuitivamente en la figura 7 del apartado de resultados, y matemáticamente por la desviación estándar, que es de 476.67 en el grupo sin tumor y de 498.88 en el grupo con tumor. Añadiendo al estudio estadístico el grupo de pacientes con histología incierta sigue sin alcanzarse ninguna significación estadística, aunque este grupo muestra una leve diferencia al alza, intrascendente por su escasa cuantía y por el escaso número de suje-

tos pertenecientes a este subgrupo. Este resultado es uno de los puntos clave del estudio, pues con el suficiente tamaño de la muestra y los rotundos resultados del análisis estadístico demuestra la ausencia de relación entre la expresión de la metaloproteasa 9 en sangre periférica y el riesgo de padecer un cáncer de próstata.

Se realizó un análisis por subgrupos de la expresión de la Metaloproteasa 9 en relación al PSA. En primer lugar se agruparon los pacientes según los rangos descritos de manera clásica para este marcador, como ha sido explicado previamente. Los pacientes con PSA normal (menor o igual a 4) fueron tan solo 9, y de ellos sólo 2 presentaron tumor en la biopsia. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de MMP-9 entre ambos grupos, aunque este dato no es especialmente relevante por dos razones: en primer lugar el tamaño del subgrupo es muy pequeño, y en segundo lugar, estos pacientes fueron incluidos por presentar un tacto rectal sospechoso, lo que les hace firmemente candidatos a una biopsia de próstata independientemente de los valores de cualquier marcador tumoral.

El estudio del subgrupo de pacientes con PSA en dudoso rango patológico (4-10 ng/ml) es especialmente interesante pues en estos pacientes se requiere información extra a la hora de decidir la biopsia prostática, siendo por tanto los más conflictivos en la práctica clínica. Además son con mucho el grupo más numeroso tanto en la práctica clínica como en el presente estudio. Se obtuvieron datos de 157 pacientes, de los cuales 50 presentaron un cáncer de próstata y 7 pacientes presentaron histologías inciertas. Se observó una escasa tendencia de los pacientes diagnosticados de adenocarcinoma prostático a presentar menores niveles de MMP-9 en los valores estadísticos descriptivos, pero muy lejos de la significación estadística con $p=0.4841$ para la comparación entre pacientes con y sin tumor, y más lejos aún comparando los tres grupos. Esta tendencia a presentar mayores cifras de MMP-9 en los pacientes sin tumor puede deberse al aumento de metaloproteasas que acompaña a los fenómenos inflamatorios, causa frecuente de elevación del PSA. Fue observada también una mayor dispersión de los datos en el grupo de pacientes con tumor, probablemente imagen de una enfermedad heterogénea.

Los pacientes con PSA mayor de 10 son como los que presentan un PSA normal, un grupo de menos interés para esta parte del estudio, puesto que la decisión de la biopsia, como en el caso de los pacientes con tacto rectal sospechoso, está también estandarizada. Se obtuvieron datos de 82 pacientes, de los cuales 45 presentaron un diagnóstico de tumor (cumpliendo casi con exactitud el valor predictivo positivo estimado), y hubo un caso de con una neoplasia prostática intraepitelial de alto grado. Tampoco se obtuvieron diferencias en los niveles de MMP-9, observándose una tendencia al alza de los pacientes con cáncer de próstata, grupo que de nuevo mostró una distribución más heterogénea, esta vez de manera llamativa, posiblemente producto de la variedad de tumores presentes en él.

El aumento de PSA ligado a proteínas ha sido descrito como una variable continua ligada al riesgo de padecer un tumor prostático (Catalona 1998, Lee 2006), al relacionarlo con el PSA libre. Es el valor analítico más estudiado como factor complementario al PSA para decidir una biopsia, y fue utilizado para ese propósito en muchos de los pacientes incluidos en el presente estudio. El cociente PSA libre/PSA total refleja de manera indirecta la integridad de la barrera hematoprostática (Mikolajczyk 2002), pues al fracturarse la barrera, formas activas de PSA pasan al torrente sanguíneo en mayor proporción, uniéndose a proteínas plasmáticas. Teniendo en cuenta que una de las principales funciones de la MMP-9 es la disolución de las membranas basales (especialmente en el proceso de crecimiento y progresión tumorales) (Clark 2007) cabe pensar que la elevación de la MMP-9 podría actuar como factor intermedio en la disminución del cociente PSA libre/PSA total.

Se dividió la muestra en dos grupos, utilizando el punto de corte tomado para el cociente de PSA libre/PSA total, el 15%, obteniendo datos de 168 pacientes (lo que refleja la gran cantidad de pacientes en los que existen dudas razonables acerca de la idoneidad de realizar una biopsia). En el grupo de PSA l/t \leq 15% se incluyeron 153 pacientes, con 57 diagnósticos de tumor y 4 histologías indeterminadas. Los pacientes con tumor prostático presentaron de nuevo un muy leve tendencia en los parámetros descriptivos a presentar cifras menores de MMP-9 que los pacientes sin tumor, pero estas diferencias fueron intrascendentes estadísticamente.

También como en el caso del estudio de toda la muestra, y de los anteriores estudios por subgrupos, hubo mayor dispersión de los datos en el grupo de los pacientes con tumor confirmado. Añadir al análisis a los pacientes con histologías indeterminadas no aportó variaciones por el escaso número de pacientes en este subgrupo, y por las cifras similares de los resultados, aunque se observan una mediana y moda superiores a los otros dos grupos.

Los pacientes con PSA $l/t > 15\%$ fueron escasos, dato esperable considerando que en el caso de duda éste es el parámetro que aconseja evitar la biopsia, tan sólo fueron incluidos 15 pacientes. Aunque por el escaso tamaño del subgrupo pudiera no haberse conseguido suficiente potencia estadística, se mantuvieron los resultados anteriores, sin grandes diferencias en los parámetros descriptivos y con ausencia de significación estadística.

5.5. La metaloproteasa 9 como marcador pronóstico

Para valorar la capacidad pronóstica de la MMP-9 plasmática en el carcinoma de próstata, se estudió la relación con diferentes factores pronósticos conocidos: el grado Gleason y los estadios clínicos T, N y M.

Ha sido demostrado que la concordancia entre el grado Gleason de la biopsia y el de la pieza de prostatectomía no siempre coinciden, principalmente por el hallazgo de grados Gleason superiores en las piezas quirúrgicas que en las biopsias (Köksal 2000, Stav 2007). Debido a que el presente trabajo se basa en los hallazgos de la biopsia, esta circunstancia afectaría al estudio estadístico realizado. Cabe esperar que en la muestra existan varios tumores incorrectamente cifrados, especialmente teniendo en cuenta que el número de cilindros tomados por paciente no es muy alto, pues a mayor número de cilindros de la biopsia, mayor concordancia con el grado Gleason final (Divrik 2007). Este factor de confusión sin embargo no tendría consecuencias sobre la validez interna del estudio, al distribuirse al azar entre los pacientes, afectando solamente a la potencia estadística.

Se obtuvieron datos de 94 pacientes, agrupándose principalmente alrededor de los grados medios y altos (los grados Gleason 6 y 7 aglutinan más del 50% del total de la muestra, con 47 y 28 pacientes respectiva-

mente). Al comparar los niveles de expresión plasmática de MMP-9 no se observan diferencias estadísticas, y en todos los grupos se observa una importante dispersión de las cifras. Cuando se agrupan los datos en grados Gleason bajos, medios y altos sigue sin alcanzarse la significación, pero se observa una clara tendencia a la disminución de la MMP-9 con el aumento del Gleason, visible en la figuras 12 y 13 del apartado de resultados. Sin que sea posible ofrecer una causa probada para este fenómeno, sugerimos que podría existir un sesgo de selección para los pacientes con indicación de biopsia prostática: Los fenómenos inflamatorios prostáticos o los crecimientos benignos son una causa frecuente de elevación del PSA, e importantes productores de confusión a la hora de interpretar los niveles de PSA sérico. Los pacientes con grados citológicos tan bajos posiblemente no sean portadores de tumores que alteren tanto el PSA como para indicar una biopsia, sino que podrían ser hallazgos casuales en la biopsia de un paciente con elevación del PSA secundaria a fenómenos benignos, que quizá tengan más efecto sobre los niveles de MMP-9 que el propio tumor prostático.

Continuando con la evaluación de la capacidad pronóstica de la MMP-9 plasmática en el carcinoma prostático también fue realizado un estudio por subgrupos en función del estadio clínico. Son de sobra conocidas las limitaciones diagnósticas del tacto rectal, la tomografía abdominal y la gammagrafía ósea, como ha sido desarrollado en la introducción, pero siguen siendo hoy día los métodos más fiables de que dispone el clínico para tomar una decisión en cuanto al tratamiento. Estas limitaciones, producto de la sensibilidad y especificidad de las pruebas han de ser asumidas por el urólogo, y sus errores, aleatorios, dan lugar en un estudio a una disminución de la potencia estadística, sin incurrir en sesgos. Con hallazgos al borde de la significación estadística no debería emitirse un juicio, pero dada la solidez de los resultados obtenidos parece plausible sin embargo aceptarlos.

El estadio T se evaluó mediante un tacto rectal y una ecografía transrectal cuidadosa, realizados tras la extracción de la sangre y antes de la toma de cilindros de la biopsia, asumiendo como estadio T final el obtenido por el método más sensible en cada caso concreto. Esto hace que sean numerosos los estadios T2 frente a otros estudios de la literatura, en los

que predominan los estadios T1 (casi siempre reconvertidos en T2 tras el análisis de la pieza quirúrgica). No sólo no se encontraron diferencias entre los niveles de expresión de la MMP-9 entre los diferentes estadios T, sino que los resultados son prácticamente superponibles, con un cierto aumento de la dispersión de las cifras en los estadios bajos explicable en parte por el mayor número de casos. Los valores descriptivos tampoco mostraron tendencias al alza o a la baja. Ha sido demostrado por tanto que no existe relación entre el estadio T y la expresión de MMP-9 plasmática, a pesar de las limitaciones que puedan presentar el tacto rectal o la ecografía transrectal como método de evaluación.

El estadio N fue evaluado mediante una tomografía axial computerizada de abdomen y pelvis, realizada por dos radiólogos especialistas en Urología. Debido a que la mayoría de los pacientes presentaron cifras de PSA menores a 20 ng/ml y Gleason de 6 o menor, se realizaron pocos estudios, obteniendo datos de tan solo 34 pacientes. De ellos sólo cinco presentaron adenopatías patológicas, por lo que fueron clasificados como N1 y el resto presentaron estudios sin alteraciones. Los valores estadísticos descriptivos de la MMP-9 son similares en ambos grupos, la desviación estándar es parecida y no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas en los niveles plasmáticos de MMP-9, por lo que hay que asumir que el estadio N no genera diferencias de expresión de la MMP-9 plasmática. En este caso los resultados deben ser tomados con cautela, porque el escaso tamaño del subgrupo y las deficiencias en la sensibilidad de la técnica podrían haber ocultado diferencias.

El estadio M fue valorado mediante la realización de una gammagrafía ósea, actualmente considerada como la técnica más fiable para el diagnóstico de metástasis óseas. Como en el caso del estadio N, son pocos los pacientes que fueron evaluados, tan solo 35, con 8 resultados positivos, clasificados como M1. También como en el caso del estadio N los valores descriptivos, la dispersión y el valor p ($p=0.7229$) muestran la casi total coincidencia entre ambos grupos. De igual manera la potencia estadística estaría afectada por el escaso tamaño del subgrupo y las limitaciones de la técnica utilizada, aunque las similitudes entre los grupos son tan pronunciadas que parece posible descartar la asociación entre el nivel de metaloproteasa 9 plasmática y el estadio clínico M.

Para finalizar el estudio fueron realizados dos estudios de correlación. El primero de ellos relacionó los niveles de MMP-9 con los de PSA, sin encontrarse relación entre ellos, lo que demuestra que estos dos marcadores son independientes entre sí. La correlación entre MMP-9 y PSAI/t también descartó relación entre estos dos parámetros. Como se ha desarrollado en la introducción, el PSAI/t es un marcador indirecto de fractura de la barrera hematoprostática, y la MMP-9 en teoría es uno de los principales factores para la ruptura de esa barrera, por lo que la ausencia de relación entre ambos, junto con el resto de sólidos resultados del presente estudio, parecen descartar la ausencia de relación entre la expresión plasmática de la metaloproteasa de matriz 9 y el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata.

6. Conclusiones

1. La expresión plasmática de metaloproteasa de matriz 9 no guarda relación con la presencia o ausencia de un tumor prostático.
2. En los casos de carcinoma prostático la expresión plasmática de Metaloproteasa de matriz 9 no guarda relación con el estadio clínico tumoral.
3. En los casos de carcinoma prostático la expresión plasmática de Metaloproteasa de matriz 9 no guarda relación con el grado citológico.
4. En los casos de carcinoma prostático la expresión plasmática de Metaloproteasa de Matriz 9 no ha demostrado relación con el pronóstico tumoral.

Bibliografía

Ala-aho R, Kahari VM: Collagenases in cancer. *Biochimie* 2005 Mar-Apr; 87 (3-4): 273-86.

Allard WJ, Cheli CD, Morris DL, Goldblatt J, Pierre Y, Kish L, Chen Y, Dai J, Vessella RL, Chan DW, Schwartz MK, Zhou Z, Yeung KK: Multicenter evaluation of the performance and clinical utility in longitudinal monitoring of the Bayer Immuno 1 complexed PSA assay. *Int J Biol Markers* 1999 Apr-Jun; 14(2): 73-83.

Allard WJ, Zhou Z, Yeung KK: Novel immunoassay for the measurement of complexed prostate-specific antigen in serum. *Clin Chem* 1998; 44: 1216.

Alvertsen: Screening for prostate cancer is neither appropriate nor cost-effective. *Urol Clin North Am* 1996; 23 (4): 521-530.

Baade PD, Youlten DR, Krnjacki LJ: Internacional epidemiology of prostate cancer: geographical distribution and secular trends. *Mol Nutr Food Res* 2009 feb; 53(2): 171-84.

Beck IM, Rückert R, Brandt K, Mueller MS, Sadowsky T, Brawer R, Schirmacher P, Mentlein R, Sedlacek R: MMP19 is essential for T cell development and T cell-mediated cutaneous immune response. *PLoS One* 2008 June 4; 3(6): e2343.

Benaud C, Dickson RB, Thompson EW: Roles of the matrix metalloproteases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998 Jul; 50(2): 97-116

Benson MC, Whang IS, Pantuck A, Ring K, Kaplan SA, Olsson CA, Cooner WH: Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J Urol* 1992 Mar; 147 (3 Pt 2): 815-6.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tazawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D: Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000 Oct; 2(10): 737-44.

Berker D, Isik S, Erden G, Tutunku YA, Ozcan HN, Caner S, Tekelek B, Aydin Y, Guler S: Using Serum Matrix Metalloproteinase-9 Levels in the Diagnosis of Functional Adrenal Tumors. *Endocr Pract* 2010 Jan; 9:1-30.

Billis A, Guimaraes MS, Freitas LL, Meirelles L, Magna LA, Ferreira U: The impact of the 2005 international society of urological pathology consensus conference on standard Gleason grading of prostatic carcinoma in needle biopsies. *J Urol* 2008 Aug; 180(2): 548-52.

Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L; Atherogene investigators: Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloprotease 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*. 2003 Apr 1; 107(12): 1579-85.

Borràs J, Marcos-Gragera R, Torres A y Espinàs JA: Análisis de la incidencia, la supervivencia y la mortalidad según las principales localizaciones tumorales, 1985-2019: cáncer de próstata. *Med Clin (Barc)* 2008; 131(Supl 1): 63-66.

Bostwick DG, Myers RP, Oesterling JE: Staging of prostate cancer. *Semin Surg Oncol* 1994 Jan-Feb; 10(1): 60-72.

Brawer MK, Aramburu EA, Chen GL, Preston SD, Ellis WJ: The inability of prostate specific antigen index to enhance the predictive value of prostate specific antigen in the diagnosis of prostatic carcinoma. *J Urol* 1993 Aug; 150(2 Pt 1): 369-73.

Brawer MK: Prostatic-specific antigen: current status. *Cancer J Clin* 1999; 49: 264.

Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, et al.: Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA* 1992; 267: 2215.

Carter HB: Prostate cancers in men with low PSA levels—must we find them?. *N Engl J Med* 2004; 350: 2292.

Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, Brawer MK, Flanigan RC, Patel A, Richie JP, deKernion JB, Walsh PC, Scardino PT, Lange PH, Subong EN, Parson RE, Gasior GH, Loveland KG, Southwick PC: Use of percentage of free prostatic-specific antigen to enhance the differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter trial. *JAMA* 1998 May 20; 297(19): 1542-7.

Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, deKernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL: Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol* 1994 May; 151(5): 1283-90.

Cepeda Piorno J, Rivas del Fresno M, Fuente Martín E et al: Ventajas y riesgos de la utilización del antígeno prostático específico (PSA) en el área sanitaria V de Gijón. (Asturias). *Arch Esp Urol* 2005; 58 (5): 403-411.

Cho YB, Lee WY, Song SY, Shin HJ, Yun SH, Chum HK: Matrix metalloproteinase-9 activity is associated with poor prognosis in T3-T4 node-negative colorectal cancer. *Hum Pathol*. 2007 Nov; 38(11): 1603-10. Epub 2007 Jul 31.

Chun TH, Sabeh F, Ota I, Murphy H, McDonagh KT, Holmbeck K et al.: MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. *J Cell Biol* 2004; 167: 757-767.

Clark JC, Thomas DM, Choong PF, Dass CR: RECK—a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2007 Dec; 26(3-4): 675-83.

Coley CM, Barry MJ, Fleming C, Mulley AG: Early detection of prostate cancer. Part I: Prior probability and effectiveness of tests. The American College of Physicians. *Ann Intern Med* 1997 Mar 1; 126(5): 394-406.

Coussens LM and Werb Z: Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420(6917):860-867.

Coussens LM, Fingleton B and Matrisian L: Matrix metalloproteinases inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 2002; 295(5564): 2387-92.

Crawford ED: Prostate Cancer Awareness Week: September 22 to 28, 1997. *CA Cancer J Clin* 1997 Sept-Oct; 47(5): 288-96.

Curry TE Jr. And Osten KG: The Matrix Metalloproteinases system: Changes, Regulation, and Impact through the Ovarian and Uterine reproductive cycle. *Endocrine Reviews* 2003; 24(4): 428-465.

D'Amico AV, Chen MH, Roehl KA, Catalona WJ: Preoperative PSA velocity and the risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy. *N Engl J Med* 2004 Jul 8; 351(2): 125-135.

De Cicco C, Ravasi L, Zorzino L, Sandri MT, Botteri E, Verweij F, Granchi D, de Cobelli O, Paganelli G: Circulating levels of VCAM and MMP-2 may help identify patients with more aggressive prostate cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008 May; 8(3): 199-206.

Divrik RT, Eroglu A, Sahin A, Zorlu F, Ozen H: Increasing the number of biopsies increases the concordance of Gleason scores of needle biopsies and prostatectomy specimens. *Urol Oncol* 2007 Sep-Oct; 25(5): 376-82.

Egeblad M and Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Rev Cancer*. 2002; 2 161-174.

El Ramy R, Verot A, Mazaud S, Odet F, Magre S, Le Magueresse-Battistoni B: Fibroblast Growth Factor (FGF)2 and FGF9 mediate mesenchymal-epithelial interactions of peritubular and Sertoli cells in the rat testis. *J Endocrinol* 2005 Oct; 187(1): 135-47.

El-Shirbiny AM: Prostatic Specific Antigen. *Adv Clin Chem* 1994; 31: 99-133.

Enlund A, Pedersen K, Boeryd B, Varenhorst E: Transrectal ultrasonography compared to histopathological assesment for local staging of prostatic carcinoma. *Acta Radiol* 1990; 31(6): 597-600.

Epstein JI, Allsbrook WJ Jr, Amin MB, Egevad LL; ISUP grading comitee. The 2005 International Society for Urologic Pathology (ISUP) Consensus Conferenco on Gleason grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1228-42.

Escaff S, Fernandez JM, Gonzalez LO, Suarez A, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez JM, Vizoso FJ: Study of Matriz Metalloproteases and their inhibitors in prostate cancer. *Br J Cancer* 2010 Mar 2; 102(5):922-9.

Escaff S, Fernandez JM, Gonzalez LO, Suarez A, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez JM, Vizoso FJ: Comparative study of stromal metalloproteases expresion in patients with benign hyperplasia and prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; May 28.

Escaff S, Fernandez JM, González Luis O, Suárez A, González-Reyes S, González JM, Vizoso FJ. Collagenase-3 expression by tumor cells and gelatinase B expression by stromal fibroblast-like cells are associated with biochemical recurrence after radical prostatectomy in patients with prostate cancer. *World J Urol* 2010 Oct 1.

Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking AP, Bellet D: Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum Reprod Update* 2007 Mar.Apr; 13(2): 121-41.

Fingleton B, Vago-Gogola T, Crawford HC and Matrisian L: Matrilysin expression selects for cells with reduced sensivity to apoptosis. *Neoplasia* 2001; 3(6): 459-68.

Fingleton B: Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. *Front Bios* 2006; 11:479-491.

Fowke JH, Motley SS, Smith JA Jr, Cookson MS, Concepcion R, Chang SS, Byerly S: Association of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, prostate specific antigen and prostate volume. *J Urol* 2009 May; 181(5): 2064-70.

Friedl P and Wolf K: Tube travel: The Role of Proteases in Individual and Collective Cancer Cell Invasion. *Cancer Res* 2008 Sept; 68(18): 7247-49.

Gill SE, Parks WC: Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40 (6-7): 1334-47.

Gleason DF, Mellinger G, VACURG: Prediction of prognosis for prostatic carcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974; 111: 58.

Gleason DF: Clasification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 1966 Mar; 50(3): 125-8.

Goldman S, Shalev E: MMPS and TIMPS in ovarian physiology and physiopathology. *Front Biosci* 2004 Sep; 9: 2474-83.

Gosselaar C, Kranse R, Roobol MJ, Schröder FH: The interobserver variability of digital rectal examination in a large randomized trial for the screening of prostate cancer. *Prostate* 2008 Jun 15; 68(9): 985-93.

Granado de la Orden S, Saá Requejo C, Quintás Viqueira A: Situación epidemiológica del cáncer de próstata en España. *Actas Urol Esp* 2006; 30 (6): 574-582.

Greiff AH, Fischer WM, Sehgal I: Paracrine communication between malignant and non-malignant prostate epithelial cells in culture alters growth rate, matrix protease secretion and in vitro invasion. *Clin Exp Metastasis*. 2002; 19(8): 727-33.

Gross G and Nagai Y: Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. *Biochemistry* 1965; 54: 1197-1204.

Guan KP, Ye HY, Yan Z, Wang Y, Hou SK: Serum levels of endostatin and matrix metalloproteinase-9 associated with high stage and grade primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2003 Apr; 61(4): 719-23.

Guimaraes MS, Quintal MM, Meirelles LR, Magna LA, Ferreira U, Billis A: Gleason Score as predictor of clinicopathologic findings and biochemical (PSA) progression following radical prostatectomy. *Int Braz J Urol* 2008 Jan-Feb; 34(1): 23-9.

Gustafsson O, Norming U, Almgard LE, Fredriksson A, Gustafsson G, Harving B, Nyman CR: Diagnostic methods in the detection of prostate cancer: a study of a randomly selected population of 2,400 men. *J Urol* 1992 Dec; 148(6):1827-31.

Halpert B, Sheehan EE, Schmalhorst WR, Scott R: Carcinoma of the prostate. Survey of 5,000 autopsies. *Cancer* 1963; 16: 737-742.

Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, Lively JC, Maeshima Y, Yang C, Hynes RO, Werb Z, Sudhakar A, Kalluri R: Physiological levels of tumstatin, a fragment of the collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell* 2003 Jun; 3(6): 589-601.

Hanahan D and Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57-70.

Hara M, Koyanagi Y, Inoue T, Fukuyama T: Physico-chemical characteristics of "gamma-seminoprotein" an antigenic component specific for human seminal plasma. *Jpn J Legal Med* 1971; 25: 322-4.

Hara T, Miyazaki H, Lee A, Tran CP, Reiter RE: Androgen receptor and invasion in prostate cancer. *Cancer Res*. 2008 Feb 15; 68(4): 1128-35.

Harada K, Sakai I, Ishimura T, Inoue TA, Hara I, Miyake H: Clinical symptoms in localized renal cell carcinoma reflect its invasive potential: comparative study between incidentally detected and symptomatic diseases. *Urol Oncol*. 2006 May-Jun; 24(3): 201-6.

Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, Zatton F: Guia de la AEU para el cáncer de próstata. *Actas Urol Esp* 2009; 33(2):113-126.

Hoikkala S, Pääkkö P, Soini Y, Mäkitaro R, Kinnula V, Turpeenniemi-Hujanen T: Tissue MMP-2 and MMP-9 [corrected] are better prognostic factors than serum MMP-2/TIMP-2--complex or TIMP-1 [corrected] in stage [corrected] I-III lung carcinoma. *Cancer Lett.* 2006 May 8; 236(1): 125-32.

Hudson MA, Bahnson RR, Catalona WJ: Clinical use of prostatic-specific antigen in patients with prostate cancer. *J Urol* 1989; 142(4):1011-7.

Hurst NG, Stocken DD, Wilson S, Keh C, Wakelam MJ, Ismail T: Elevated serum matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) concentration predicts the presence of colorectal neoplasia in symptomatic patients. *Br J Cancer* 2007 Oct 8; 97(7): 971-7.

Imper V and Van Wart HE: Substrate specificity and mechanisms of substrate recognition of the Matrix Metalloproteases. In: *Matrix Metalloproteases* (Parks WC and Mecham RP, eds) pag 219-242, Academic, St Louis, MS.

Inamoto T, Azuma H, Sakamoto T, Kiyama S, Ubai T, Kotake Y, Watanabe M, Katsuoka Y: Invasive ability of human renal cell carcinoma cell line Caki-2 is accelerated by gamma-aminobutyric acid, via sustained activation of ERK $\frac{1}{2}$ inducible matrix metalloproteinases. *Cancer Invest.* 2007 Oct; 25(7): 574-83.

Isariyawongse BK, Sun L, Banez LL, Robertson C, Polascik TJ, Maloney K, Donatucci C, Albala D, Mouraviev V, Madden JF, Moul JW: Significant discrepancies between diagnostic and pathologic Gleason sums in prostate cancer: the predictive role of age and prostate-specific antigen. *Urology* 2008; 72(4): 882-6.

Ishida H, Murata N, Tada M, Okada N, Hashimoto D, Kubota S, Shirakawa K, Wakasugi H: Determining the levels of matrix metalloproteinase-9 in portal and peripheral blood is useful for predicting liver metastasis of colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2003 Apr; 33(4): 186-91.

Jeziorska M, Nagase H, Salamonsen LA and Woolley DE: Immunolocalization of the matrix metalloproteinases gelatinase B and stromelysin in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Reprod Fertil* 1996; 107: 43-51.

Jobim FC, Schwartzmann G, Xavier NL, Uchoa Dde M, Saciloto M, Chemello N: Expression of MMP-9 and VEGF in breast cancer: correlation with other prognostic indicators. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2008 Jun; 30(6): 287-93.

Johansson JE, Adami OH, Andersson SO, Bergström R, Krusemo UB, Kraaz W: Natural history of localised prostatic cancer. A population-based study in 223 untreated patients. *The Lancet* 1989 Apr 15; 1(8642): 799-803.

Jost M, Folgueras AR, Frerart F, Pendas AM, Blacher S, Houard X, Berndt S, Munant C, Cataldo D, Alvarez J, Melen-Lamelle L, Foidart JM, López-Otín C, Noël A: Earlier onset of tumoral angiogenesis in matrix metalloproteinase-9-deficient mice. *Cancer Res* 2006 May; 66(10): 5234-41.

Jung K, Klotzek S, Stephan C, Mannello F, Lein M: Impact of blood sampling on the circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 3, 7, 8, and 9. *Clin Chem* 2008 Apr; 54(4): 772-3.

Jung K, Krell HW, Ortel B, Hasan T, Römer A, Schnorr D, Loening SA, Lein M: Plasma matrix metalloproteinase 9 as biomarker of prostate cancer progression in Dunning (Copenhagen) rats. *Prostate.* 2003 Feb 15; 54(3): 206-11.

Jung K, Lein M, Laube C, Lichtinghagen R: Blood specimen collection methods influence the concentration and the diagnostic validity of matrix metalloproteinase 9 in blood. *Clin Chim Acta* 2001; 314: 241-244.

Kargozaran H, Yuan SY, Breslin JW, Watson KD, Gaudreault N, Breen A, Wu MH: A role for endothelial-derived matrix metalloproteinase-2 in breast cancer cell transmigration across the endothelial-basement membrane barrier. *Clin Exp Metastasis* 2007; 24(7): 495-502.

Kawakami J, Siemens DR, Nickel JC: Prostatitis and prostate cancer: implications for prostate cancer screening. *Urology* 2004 Dec; 64(6): 1075-80.

Kawamura K, Kamiya N, Suyama T, Shimbo M, Oosumi N, Suzuki H, Ueda T, Tobe T, Igarashi T, Ito H, Ishikura H: In situ gelatinolytic activity correlates with tumor progression and prognosis in patients with bladder cancer. *J Urol.* 2004 Oct; 172(4 Pt 1): 1480-4.

Köksal IT, Ozcan F, Kadioglu TC, Esen T, Kilicaslan I, Tunc M: Discrepancy between Gleason scores of biopsy and radical prostatectomy specimens. *Eur Urol* 2000 Jun; 37(6): 670-4.

Kousidou OC, Mitropoulou TN, Roussidis AE, Kletsas D, Theocharis AD, Karamanos NK: Genistein suppresses the invasive potential of human breast cancer cells through transcriptional regulation of metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Int J Oncol.* 2005 Apr; 26(4): 1101-9.

Kousidou OC, Roussidis AE, Theocharis AD, Karamanos NK: Expression of MMPs and TIMPs genes in human breast cancer epithelial cells depends on cell culture conditions and is associated with their invasive potential. *Anticancer Res.* 2004 Nov-Dec; 24(6): 4025-30.

Krane SM, Inada M: Matrix metalloproteinases and bone. *Bone* 2008 Jul; 43(1): 7-18.

Lee ER, Murphy G, El-Alfy M, Davoli MA, Lamplugh L, Docherty AJ and Leblond CP: Active gelatinase B is identified by histozytography in the cartilage resorption sites of developing long bones. *Dev Dyn* 1999; 215: 190-205.

Lee R, Localio AR, Armstrong K, Malkowicz SB, Schwatz JS: A meta-analysis of the performance of the characteristics of the free prostatic-specific antigen test. *Urology* 2006 Apr; 67(4): 762-8.

Lichtinghagen R, Musholt PB, Lein M, Römer A, Rudolph B, Kristiansen G, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA, Jung K: Different mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue. *Eur Urol.* 2002 Oct; 42(4): 398-406.

Lichtinghagen R, Musholt PB, Stephan C, Lein M, Kristiansen G, Hauptmann S, Rudolph B, Schnorr D, Loening SA, Jung K: mRNA expression profile of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in malignant and non-malignant prostatic tissue. *Anticancer Res.* 2003 May-Jun; 23(3B): 2617-24.

Lilja H, Christensson A, Dahlen U, et al: Prostate-specific antigen in human serum occurs predominantly in complex with α -1 antiqumiotripsina. *Clin Chem* 1991; 37: 1618.

Liotta LA, Tryggvason K, Garvisa S, Hart I, Foltz CM and Shafie S: Metastatic potencial correlates with enzymatic degradation of basement membrane. *Nature* 1980; 284(5751): 67-68.

London CA, Sekhon HS, Arora V, Stein DA, Iversen PL, Devi GR: A novel antisense inhibitor of MMP-9 attenuates angiogenesis, human prostate cancer cell invasion and tumorigenicity. *Cancer Gene Ther.* 2003 Nov; 10(11): 823-32.

Lundwall A: Characterization of the gene for prostate-specific antigen, a human glandular kallikrein. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 1151-9.

Makowski GS, Ramsby ML: Use of citrate to minimize neutrophil matrix metalloproteinase-9 in human plasma. *Anal Biochem* 2003; 322: 283-6.

Mannello F, Tanus-Santos JE, Meschiari CA, Tonti GA: Differences in both matrix metalloproteinase 9 concentration and zymographic profile between plasma and serum with clot activators are due to the presence of amorphous silica or silicate salts in blood collection devices. *Anal Biochem* 2008; 374: 56-63.

Mannello F, Tonti GA, Bagnara GP, Papa S: Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006 Mar; 24(3): 475-81.

McGregor B, Tulloch AG, Quinlan MF, Lovegrove F: The role of bone scanning in the assessment of prostatic carcinoma. *Br J Urol* 1978; 50(3): 178-81.

Meissner A, Cohen M, Bischof P: Concentrations of circulating gelatinases (Matrix Metalloproteinase-2 and -9) are dependent on the conditions of blood collection. *Clin Chem* 2005; 51: 274-6.

Mikolajczyk SD, Marks LS, Partin AW, Rittenhouse HG: Free prostatic-specific antigen in serum is becoming more complex. *Urology* 2002; 59: 797.

Miller MC, O'Dong GJ, Partin AW, Veltri RW: Contemporary use of complexed PSA and calculated free PSA for early detection of prostate cancer: impact of changing disease demographics. *Urology* 2001; 57: 1105.

Mitsiades N, Yu W, Poulaki V, Tsokos M and Stamenkovik I: Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res* 2001; 61(2): 577-81.

Miyake H, Muramaki M, Kurahashi T, Takenaka A, Fujisawa M: Expression of potential molecular markers in prostate cancer: Correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. 1: *Urol Oncol*. 2008 Oct 9.

Miyamoto H, Altuwajri S, Cai Y, Messing EM, Chang C: Inhibition of the Akt, cyclooxygenase-2, and matrix metalloproteinase-9 pathways in combination with androgen deprivation therapy: potential therapeutic approaches for prostate cancer. 1: *Mol Carcinog*. 2005 Sep; 44(1): 1-10.

Miyata Y, Kanda S, Nomata K, Hayashida Y, Kanetake H: Expression of metalloproteinase-2, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in transitional cell carcinoma of upper urinary tract: correlation with tumor stage and survival. *Urology*. 2004 Mar; 63(3): 602-8.

Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ: The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Dec 17; 1705(2): 69-89.

Morgia G, Falsaperla M, Malaponte G, Madonia M, Indelicato M, Travali S, Mazzarino MC: Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urol Res.* 2005 Feb; 33(1): 44-50. Epub 2004 Oct 22.

Muroski ME, Roycid MD, Newcomer RG, Van den Steen PE, Opdenaker G, Monroe HR, Sahab JZ, Sang QX: Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is a putative target of chronic obstructive pulmonary disease and multiple sclerosis. *Curr Pharm Biotechnol* 2008 Feb; 9(1): 34-46.

Nabha SM, Bonfil RD, Yamamoto HA, Belizi A, Wiesner C, Dong Z, Cher ML: Host matrix metalloproteinase-9 contributes to tumor vascularisation without affecting tumor growth in a model of prostate cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2006; 23(7-8): 335-44. Epub 2006 Nov 30.

Nadler RB, Loeb S, Roehl KA, Antenor JA, Eggener S, Catalona WJ: Use of 2.6 ng/ml prostate specific antigen prompt for biopsy in men older than 60 years. *J Urol* 2005 Dec; 174(6): 2154-7, discussion 2157.

Nagase H, Visse R, Murphy G: Structure and Function of matrix metalloproteases and TIMPs. *Cardiovascular Research* 2006; 69: 562-573.

Nénan S, Boichot E, Lagente V, Bertrand CP: Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005 Mar; 100 Suppl 1: 167-72.

Oberg A, Höyhty M, Tavelin B, Stenling R, Lindmark G: Limited value of preoperative serum analyses of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2000 Mar-Apr; 20(2b): 1085-91.

Overall C. M.: Molecular determinants of metalloprotease substrate specificity: matrix metalloprotease substrate binding domains, modules and exosites. *Mol Biotechnol* 2002; 22: 51-86.

Partin AW, Carter HB, Chan DW, Epstein JI, Oesterling JE, Rock RC, Weber JP, Walsh PC: Prostate specific antigen in the staging of localized prostate cancer: influences of tumour differentiation, tumour volume and benign hyperplasia. *J Urol* 1990; 143(4): 747-52.

Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM: Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2004 Nov 15; 10(22): 7621-8.

Puente XS, Sanchez LM, Overall CM and Lopez-Otin C: Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 544-58.

Raaijmakers R, Wildhagen MF, Ito K, Paez A, de Vries SH, Roobol MJ, Schroder FH: Prostate-specific antigen change in the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer, section Rotterdam. *Urology* 2004 Feb; 63(2): 316-20.

Raffetto JD, Khalil RA: Matrix metalloproteases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2008 Jan 15; 75(2): 346-59.

Ranuncolo SM, Armanasco E, Cresta C, Bal De Kier Joffe E, Puricelli L: Plasma MMP-9 (92 kDa-MMP) activity is useful in the follow-up and in the assessment of prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2003 Sep 20; 106(5): 745-51.

Remzi M, Fong YK, Dobrovits M, Anagnostou T, Seitz C, Waldert M, Harik M, Marihart S, Marberger M, Djavan B: The Vienna Nomogram: A novel biopsy strategy defining the optimal number of cores based on patient age and total prostate volume. *J Urol* 2005 Oct; 174(4 Pt1): 1256-60.

Ries, LAG, Eisner, MP, Kosary CL et al (Eds): SEER Cancer Statistics Review, 1973-1998, National Cancer Institute. Bethesda, MD 2001; Available at: seer.cancer.gov/csr/1973_1999/.

Rodgers UR, Kevorkian L, SurrIDGE AK, Waters JG, Swinger TE, Culley K, Illman S, Lohi J, Parker AE, Clark IM: Expression and function of matrix metalloproteinase (MMP-28). *Matrix Biol* 2009 Jun; 28(5): 267-72.

Rodríguez JA, Orbe J y Páramo JA: Metaloproteasas, remodelado vascular y síndromes aterotrombóticos. *Rev Esp Cardiol* 2007; 60(9): 959-67.

Rodríguez LV, Terris MK: Risks and complications of transrectal ultrasound guided prostate needle biopsy: a prospective study and review of the literature. *J Urol* 1998 Dec; 160 (6 Pt1): 2115-20.

Roy R, Louis G, Loughlin KR, Wiederschain D, Kilroy SM, Lamb CC, Zurakowski D, Moses MA: Tumor-specific urinary matrix metalloproteinase fingerprinting: identification of high molecular weight urinary matrix metalloproteinase species. *Clin Cancer Res.* 2008 Oct 15; 14(20): 6610-7.

Rožanov DV, Ghebrehiwet B, Postnova TI, Eichinger A, Deryugina EI and Strongin AY: The hemopexin-like C-terminal domain of a membrane type I matrix metalloproteinase regulates proteolysis of a multifunctional protein, gC1qR. *J Biol Chem* 2002; 277(11): 9318-25.

Saarialho-Kere UK: Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch Dermatol Res* 1998 Jul; 290 Suppl:S47-54.

Safranek J, Pesta M, Holubec L, Kulda V, Dreslerova J, Vrzalova J, Topolcan O, Pesek M, Finek J, Treska V: Expression of MMP-7, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA in lung tissue of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and benign pulmonary disease. *Anticancer Res.* 2009 Jul; 29(7): 2513-7.

Sahlberg C, Reponen P, Tryggvason K and Thesleff I: Timp-1, -2 and -3 show coexpression with gelatinases A and B during mouse tooth morphogenesis. *Eur J Oral Sci* 1999; 107: 121-30.

Sauer CG, Kappeler A, Späth M, Kaden JJ, Michel MS, Mayer D, Bleyl U, Grobhoiz R: Expression and activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 in serum, core needle biopsies and tissue specimens of prostate cancer patients. *Virchows Arch.* 2004 Jun; 444(6): 518-26. Epub 2004 Apr 16.

Sawiki G, Salas E, Murat J, Mistza-Lane H and Radomski M W: Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature* 1997; 386: 616-19.

Escaff S, Fernandez JM, González Luis O, Suárez A, González-Reyes S, González JM, Vizoso FJ. Collagenase-3 expression by tumor cells and gelatinase B expression by stromal fibroblast-like cells are associated with biochemical recurrence after radical prostatectomy in patients with prostate cancer. *World J Urol* 2010 Oct 1.

Sehgal I, Thompson TC: Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor-beta1 in human prostate cancer cell lines. *Mol Biol Cell*. 1999 Feb; 10(2): 407-16.

Sershon PD, Barry MJ, Oesterling JE: Serum prostate-specific antigen discriminates weakly between men with benign prostatic hyperplasia and patients with organ-confined prostate cancer. *Eur Urol* 1994; 25(4): 281-7.

Sfar S, Saad H, Mosbah F, Gabbouj S, Chouchane L: TSP1 and MMP9 genetic variants in sporadic prostate cancer. 1: *Cancer Genet Cytogenet*. 2007 Jan 1; 172(1): 38-44.

Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC and Lin RH: A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res* 2001; 61(1): 237-242.

Smith DS, Catalona WJ: Rate of change in serum prostate-specific antigen as a method of prostate cancer detection. *J Urol* 1994; 152: 1163.

Sobin LH and Wittekind Ch (eds): *TNM Classification of Malignant Tumours*. 6th edn. Wiley-Liss: New York, 2002.

Spiegelman SS, McNeal JE, Freiha FS, Stamey TA: Rectal examination in volume determination of carcinoma of the prostate: clinical and anatomical correlations. *J Urol* 1986; 136(6): 1228-30.

Stav K, Judith S, Merald H, Leibovici D, Lindner A, Zisman A: Does the biopsy Gleason score accurately express the biologic features of prostate cancer? *Urol Oncol* 2007 Sep-Oct; 25(5): 383-6.

St-Pierre Y, Couillard J, Van Themsche C: Regulation of gene expression for the development of novel molecular targets against cancer and inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2004 Oct; 8(5): 473-89 .

Suzuki M, Iizasa T, Fujisawa T, Baba M, Yamaguchi Y, Kimura H, Suzuki H: Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in non-small-cell lung cancer. *Invasion Metastasis*. 1998-1999; 18(3): 134-41.

Takeuchi T, Hisanaga M, Nagao M, Ikeda N, Fujii H, Koyama F, Mukogawa T, Matsumoto H, Kondo S, Takahashi C, Noda M, Nakajima Y: The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Aug 15; 10(16): 5572-9.

Tchetgen MB, Oesterling JE: The effect of prostatitis, urinary retention, ejaculation and ambulation on the serum prostate-specific antigen concentration. *Urol Clin North Am* 1997 May; 24(2): 283-91.

Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Swift RI, Abulafi AM: Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2003 Nov 20; 107(4): 541-50.

Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutiérrez G: Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *BJOG*. 2005 Apr; 112 Suppl 1: 19-22.

Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM Dwek RA, Opdenakker G: Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002 Dec; 37(6): 375-536.

Van Themsche C, Mathieu I, Parent S, Asselin E: Transforming growth factor-beta3 increases the invasiveness of endometrial carcinoma cells through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent up regulation of X-linked inhibitor of apoptosis and protein kinase c-dependent induction of matrix metalloproteinase-9.

Van Wart HE and Brikedal-Hansen H: The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5578-82.

Velasco G, Pendás AM, Fueyo A, Knäuper V, Murphy G, López-Otín C: Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J Biol Chem* 1999 Feb 19; 274(8):4570-6.

Victor WM van Hinsbergh and Pieter Koolwijk: Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovascular Res* 2008; 78: 203-12.

Vincenti MP, Brinckerhoff CE: Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *J Cell Physiol* 2007 Nov; 213(2): 355-64.

Visse R and Nagase H: Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Cir Res* 2003; 92: 827-839.

Vu ZS, Wu Q, Yang JH, Wang HQ, Ding XD, Yang F, Xu XC: Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int J Cancer*. 2008 May 1; 122(9): 2050-6.

Walsh PC, Partin AW, Epstein JI: Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years. *J Urol* 1994 Nov; 152 (5 Pt 2): 1831-6.

Wang L, Hricak H, Kattan MW, Chen HN, Scardino PT, Kuroiwa K: Prediction of organ confined prostate cancer: incremental value of MRI and MRI spectroscopic imaging to staging nomograms. *Radiology* 2006; 238(2): 597-603.

Wielockx B, Lannoy K, Shapiro SD, Itoh T, Itohara S, Vandekerhove J and Libert C: Inhibition of matrix metalloproteases blocks lethal hepatitis and apoptosis inducer by tumor necrosis factor and allows safe antitumoral therapy. *Nat Med* 2001; 7: 1202-8.

Wielockx B, Libert C, Wilson C: Matrilysin (matrix metalloproteinase 7): a new promising drug target in cancer and inflammation? *Cytokine Growth factor Rev* 2004 Apr-Jun; 15(2-3):111-5.

Wilson MJ, Sellers RG, Wiehr C, Melamud O, Pei D, Peehl DM: Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2, in primary cultures of human prostatic stromal and epithelial cells. *J Cell Physiol.* 2002 May; 191(2): 208-16.

Wolf JS Jr, Cher M, Dall'era M, Presti JC Jr, Hricak H, Carroll PR: The use and accuracy of cross-sectional imaging and fine needle aspiration cytology for detection of pelvic node metastases before radical prostatectomy. *J Urol* 1995; 153(3 Pt 2): 993-9.

Wu CY, Wu MS, Chiang EP, Chen YJ, Chen CJ, Chi NH, Shih YT, Chen GH, Lin JT: Plasma matrix metalloproteinase-9 level is better than serum matrix metalloproteinase-9 level to predict gastric cancer evolution. *Clin Cancer Res* 2007 Apr 1; 13(7): 2054-60.

Yang SF, Hsieh YS, Lin CL, Hsu NY, Chiou HL, Chou FP, Chu SC: Increased plasma levels of urokinase plasminogen activator and matrix metalloproteinase-9 in nonsmall cell lung cancer patients. *Clin Chim Acta.* 2005 Apr; 354(1-2): 91-9.

Ylisirniö S, Höyhty M, Turpeenniemi-Hujanen T: Serum matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases -1, -2 in lung cancer-TIMP-1 as a prognostic marker. *Anticancer Res.* 2000 Mar-Apr; 20(2B): 1311-6.

Zeng ZS, Huang Y, Cohen AM, Guillem JG: Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9. *J Clin Oncol*. 1996 Dec; 14 (12): 3133-40.

Zhang B, Henney A, Eriksson P, Hamsten A, Watkins H, Ye S: Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1. *Hum Genet* 1999 Nov; 105(5): 418-23.

Zhang L, Shi J, Feng J, Klocker H, Lee C, Zhang J: Type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2 and -9) in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2004; 7(4): 327-32.

Zhang LL, He DL, Li X, Li L, Zhu GD, Wang XY: [Type IV collagenase expression in human prostate carcinoma cell lines with different metastasis potentials]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2006 Oct; 12(10): 913-6.

Zhao YG, Xiao AZ, Newcomer RG, Park HI, Kang T, Chung LW, Swanson MG, Zhou HE, Kurhanewicz J, Sang QX: Activation of pro-gelatinase B by endometase/matrixlysin-2 promotes invasion of human prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2003 Apr 25; 278(17): 15056-64.

Zhong WD, Han ZD, He HC, Bi XC, Dai QS, Zhu G, Ye YK, Liang YX, Qin WJ, Zhang Z, Zeng GH, Chen ZN: CD147, MMP-1, MMP-2 and MMP-9 protein expression as significant prognostic factors in human prostate cancer. *Oncology*. 2008; 75(3-4): 230-6.

Zhu L, Tanimoto K, Robinsin S, Chen J, Witowska E, Hall S, Le T, Denbesten PK, Li W: Comparative properties of recombinant human and bovine matrix metalloproteinase-20. *Arch Oral Biol* 2008 Aug; 53(8): 786-90.

Zucker S, Pei D, Cao J, Lopez-Otin C: Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). *Curr Top Dev Biol* 2003; 54: 1-74.

ANEXO 1: Consentimiento informado

Introducción

Le solicitamos su participación en un estudio destinado a investigar el efecto que unas determinaciones analíticas (niveles sanguíneos y polimorfismos de la metaloproteasa 9) tienen sobre la salud prostática, en concreto sobre el diagnóstico y seguimiento de determinadas enfermedades prostáticas. El estudio se está llevando a cabo en el Hospital de Cabueñes, con la colaboración de Personal de La Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo y ha sido revisado y aprobado por el Comité Ético Regional.

Hemos obtenido su nombre a través de su médico, que nos ha dado permiso para contactar con usted. Su participación en el estudio es voluntaria. Puede rechazar participar en él y puede retirarse del estudio en cualquier momento sin que esto afecte su atención médica posterior.

Por favor, lea atentamente este documento y haga tantas preguntas como crea necesarias.

Explicación de los procedimientos

Si acepta participar en el estudio, su aportación consistirá en responder a las preguntas de un cuestionario, donar muestras de sangre y dar permiso para la recogida de información a partir de su historial clínico. Se le pedirá información sobre sus hábitos de vida e historia. Una enfermera extraerá una muestra de sangre (40 ml).

Las muestras recogidas serán utilizadas exclusivamente con fines científicos relacionados con los objetivos del estudio. Con las muestras de sangre se realizarán análisis genéticos y celulares que pueden estar asociados con la salud y la enfermedad prostática que esperamos que ayuden al diagnóstico de las distintas enfermedades prostáticas. Todo el material que no sea utilizado inmediatamente será conservado durante un máximo de 50 años para realizar, posiblemente, posteriores determinaciones.

Beneficios potenciales y riesgos

Aunque es poco probable que usted se beneficie directamente de este estudio, su participación es muy importante ya que contribuirá a aumentar el conocimiento de los efectos de factores analíticos sobre la salud y el diagnóstico de enfermedades prostáticas. Es poco probable que, al hacer la extracción de sangre, le salga un hematoma (“morado”).

Confidencialidad

La información obtenida en el estudio será confidencial, de acuerdo con lo que establece la Ley. Nadie, excepto los miembros del estudio, tendrá acceso a su información.

Consentimiento

He leído este documento, he hecho todas las preguntas que creía necesarias y estoy de acuerdo en participar en las siguientes partes del estudio:

Entrevista	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
------------	-----------------------------	-----------------------------

Recogida de muestra de sangre	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
-------------------------------	-----------------------------	-----------------------------

Acceso al historial clínico	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------

Firma del participante	Fecha	Nombre y Apellidos
.....

Firma del médico / entrevistador	Fecha	Nombre y Apellidos
.....

Apreciamos sinceramente su cooperación en este proyecto de investigación. Si tiene alguna pregunta sobre el estudio, puede llamar al doctor Manuel Rivas del Fresno (Tfno 985 18 50 00, extensión 85128).

Este protocolo ha sido revisado y aprobado por el Comité Ético Regional.

Estudio sobre la influencia de la Metaloproteasa 9 en la salud prostática

Parte 2 de la hoja de consentimiento informado

Como parte del estudio en el que usted ha aceptado participar, en el caso de que su médico le practique una biopsia le pedimos permiso para analizar la muestra obtenida. Asimismo en los posteriores controles ambulatorios y siempre en el caso de que se le practicara una biopsia le pedimos permiso para analizar la muestra obtenida. Finalmente, en caso de que su médico tenga que controlarlo en el futuro, nos gustaría tener la oportunidad de volver a contactar con usted.

Consentimiento

He leído este documento, he hecho todas las preguntas que creía necesarias y estoy de acuerdo en participar en las siguientes partes del estudio:

Entrevista	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
Recogida de muestra de sangre	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
Acceso al historial clínico	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>

Firma del participante

Fecha

Nombre y Apellidos

.....

.....

.....

Firma del médico / entrevistador

Fecha

Nombre y Apellidos

.....

.....

.....

Apreciamos sinceramente su cooperación en este proyecto de investigación. Si tiene alguna pregunta sobre el estudio, puede llamar al doctor Manuel Rivas del Fresno (Tfno 985 18 50 00, extensión 85128).

Este protocolo ha sido revisado y aprobado por el Comité Ético Regional.

ANEXO 2: Historia clínica

Nombre del paciente:

Edad:..... Fecha: Nacimiento:

Dirección:

Teléfono de contacto: /

ID: NHC:.....

A. personales

Aletias: Sí No Especificar:

Fumador: Sí No N° paquetes año:

Exfumador: Sí No N° paquetes año:

Ingesta etílica: Sí No Especificar cantidad:.....

Diabetes: Sí No Especificar tiempo evolución:.....

HTA: Sí No Especificar tiempo evolución:

Hiperlipemias Sí No Especificar:

Problemas cardiacos Sí No Especificar:

Otros antecedentes médicos: Sí No Especificar

.....

.....

.....

Intervenciones Quirúrgicas: Sí No Especificar

.....

.....

Tratamientos habituales (especificar todos)

.....
.....
.....
.....

Cardiopatía isquémica Sí No

Especificar tiempo evolución:

.....

Enfermedades inflamatorias activas Sí No

Ver Criterios exclusión.

TUmores malignos en los últimos 5 años Sí No

Ver Criterios exclusión.

Motivo inicial del diagnóstico (reconocimiento prostático, clínica prostática, etc)

.....
.....

PESO: **TALLA:**

Agradecimientos

Son muchas las personas que han aportado algo en este proyecto, y sin las cuales no hubiera sido posible. Por ello quiero dar mis más sinceras gracias quienes me apoyaron para hacerlo posible:

A mi madre, Emilia que pacientemente colaboró labores de secretariado y además, me trajo al mundo.

A **Adonina**, mi tutora, por su asesoría técnica, dirección y apoyo.

A **Pachi** y a **Laura**, del IUOPA, por su trabajo, siempre demasiado oscuro.

A **Conchita** y a **Marta** por la paciencia que tuvieron conmigo recogiendo datos.

Al **Servicio de Urología del Hospital de Cabueñes**, por su imprescindible apoyo.

A mis **compañeros de residencia**, por las horas compartidas.

A los **pacientes** que se prestaron a participar, regalándome su tiempo (y su sangre).

A **Duna**, que lo ha sufrido conmigo.

A **Jesús**, nominado a un Grammy latino.

A **Rocco**, que lo hizo más llevadero.

Y especialmente gracias a **Manolo**, que ha dejado una buena parte de su salud en el empeño.

