

Universitat Autònoma de Barcelona



DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MORFOLÒGIQUES
FACULTAT DE MEDICINA
Departament d'Anatomia Patològica
Hospitals Vall d'Hebron

**EXPRESIÓN DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS
VEGF Y bFGF, Y DE LOS RECEPTORES Flt-1 Y FLK/
KDR EN LA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL
PROSTÁTICA**

Directora: Ines María de Torres Ramírez

Tesi Doctoral presentada por Judit Pallarés Quixal
para acceder al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Barcelona, Enero del 2004



La Doctora Ines María de Torres Ramírez, Profesora Titular de Anatomía Patológica del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universitat Autònoma de Barcelona, Doctora en Medicina y Cirugía y adjunta del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Vall d' Hebron, certifica que la tesis: “**Expresión de los factores angiogénicos VEGF y bFGF, y de los receptores Flt-1 y FLK/ KDR en la neoplasia intraepitelial prostática**”, de la que es autora la Licenciada en Medicina y Cirugía, Judit Pallarés Quixal, ha sido realizada bajo su dirección y se encuentra en condiciones de ser defendida ante el tribunal correspondiente.

Para que así conste y a los efectos oportunos, firmo la presente certificación a Barcelona, a día 24 de Enero de 2004.

Dr. Inés de Torres Ramírez

*“ En la ciencia como en la vida
el fruto llega después del amor”
Santiago Ramón y Cajal*

*Als meus pares i la meva àvia
Al meu germà
A Carlos*

AGRAÏMENTS

Són moltes les persones que han contribuït a la realització d'aquesta tesi doctoral amb el seu recolzament i ànims per tirar endavant. A totes elles va dirigit el meu sincer agraïment . Faig constar expressament el meu reconeixement a les següents persones i institucions:

A la Dra. Ines de Torres Ramírez, Professora Titular d'Anatomia Patològica de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona y Metge Especialista del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Vall d'Hebron, directora d'aquesta tesi doctoral, per haver recolzat incondicionalment la realització d'aquesta tesi en els moments difícils. A ella, a més de considerar-la una excel.lent professional i amiga, li he d'agrair el haver-me introduït i ensenyat en l'Anatomia Patològica i el haver estimulat la meva vocació investigadora.

Al Prof. Augusto Moragas Redecilla, Catedràtic d'Anatomia Patològica i Professor Emèrit de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona. Li he d'agrair la formació rebuda durant el meu període com a Metge Intern Resident com a Cap del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Vall d'Hebron.

Al Prof. Xavier Matías-Guiu Guia, Catedràtic d'Anatomia Patològica de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida i Director Clínic del Servei d'Anatomia Patològica i Genètica Molecular del Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida, per haver-me facilitat la realització d'aquesta tesi doctoral i per el seu recolzament incondicional en la realització d'aquesta tesi doctoral.

Al Fredi Rojo del Servei d'Anatomía Patològica dels Hospitals Vall d'Hebron, i al Personal Tècnic, per l'ensenyament pràctic i la seva col.laboració en la realització de tècniques immnunohistoquímiques. A la resta del personal mèdic, tècnic i companys residents, així com secretàries del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Vall d'Hebron.

Al Dr. Lluís Armadans del Servei de Epidemiologia i Medicina Preventiva de l'Hospital Vall d'Hebron, per el seu suport en l'anàlisi estadístic del treball.

A la meva amiga Maritza per estar al meu costat en els moments difícils.

**EXPRESIÓN DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS VEGF Y bFGF, Y DE
LOS RECEPTORES Flt-1 Y FLK/ KDR EN LA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL
PROSTÁTICA**

Judit Pallarés Quixal

Índice

I. INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER PROSTÁTICO.

1.1-EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER PROSTÁTICO.

1.2-EPIDEMIOLOGÍA DE LA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL DE ALTO GRADO.

1.3- LESIONES PRECURSORAS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.

1.3.1-Neoplasia Intraepitelial Prostática de Alto Grado (PINAG).

1.3.2-Hiperplasia Adenomatosa Atípica (HAA).

1.3.3-Otras lesiones..

1.4- ETIOPATOGENIA DEL CÁNCER PROSTÁTICO.

1.4.1-Factores personales y constitucionales.

1.4.2-Factores raciales.

1.4.3-Factores genéticos.

1.4.4-Factores hormonales.

1.4.5-Factores dietéticos.

1.4.6-Factores ambientales.

1.4.7-Miscelánea.

1.5-FACTORES PRONÓSTICOS.

1.5.1-Factores Pronósticos de Categoría I.

1.5.2-Factores Pronósticos de Categoría II.

1.5.3-Factores Pronósticos de Categoría III.

2. PRINCIPIOS BIOLÓGICOS DE LA ANGIOGÉNESIS

2.1-FACTORES ANGIOGÉNICOS.

2.1.1-El Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).

2.1.2-El Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF).

2.1.3-Los receptores del Factor de crecimiento vascular endotelial: Receptor del Factor de crecimiento vascular de tipo I (VEGFR1)(Flt-1)

Receptor del Factor de crecimiento vascular de tipo II (VEGFR2)(FLK/KDR).

2.2- VASCULOGÉNESIS Y REMODELAMIENTO VASCULAR.

3- ANGIOGÉNESIS TUMORAL.

3.1- Adquisición del Fenotipo Angiogénico en las células tumorales.

3.2-Mecanismos de la Angiogénesis Tumoral.

3.3-Formación de Vasos Tumorales.

3.4-Estructura y Función de los Vasos Tumorales

3.5-Regulación de la Angiogénesis Tumoral .

3.6 -Fenotipo Angiogénico pre-tumoral.

4-ANGIOGÉNESIS Y PRÓSTATA.

4.1-Arquitectura vascular prostática.

4.2-Arquitectura vascular en la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado y el carcinoma invasor.

4.3-Expresión de factores angiogénicos en el tejido prostático.

invasor.

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1-Obtención de los parámetros clínico-patológicos.

3.2-Estudio inmunohistoquímico.

3.3-Determinaciones experimentales.

3.3.1- Expresión de VEGF, bFGF, Flt-1 y FLK/KDR.

3.3.2-Estudio de la proliferación celular.

3.3.3-Estudio de la densidad vascular.

3.4-Análisis estadístico.

IV.RESULTADOS.

4.1-Análisis de los parámetros clínico-patológicos.

4.2-Análisis de los parámetros clínico-patológicos entresí.

4.3-Estudio de la densidad vascular.

4.4-Estudio de la proliferación celular (Ki67).

4.5-Estudios inmunohistoquímicos.

**4.5.1-Estudio de la expresión de VEGF y de sus receptores
Flt-1 y FLK/KDR.**

4.5.2-Estudio de la expresión de bFGF.

V. DISCUSIÓN.

VI. CONCLUSIONES.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata es actualmente el tumor maligno con mayor incidencia en el mundo Occidental (Foster y col., 1999). Por este motivo, en la última década la investigación en el cáncer de próstata ha pasado a tener un papel relevante en biomedicina.

Existen tres factores fundamentales que han inducido a profundizar en el estudio de esta entidad. El primero, la apreciación de la magnitud e impacto que el cáncer de próstata tiene en la incidencia y mortalidad por cáncer a escala mundial, y sobretodo en los países industrializados.

En segundo lugar, la aparición y el desarrollo de los programas de screening primario en los que el PSA tiene un papel controvertido, pero fundamental, permitiendo el diagnóstico precoz del cáncer prostático, y la introducción de la prostatectomía radical protocolizada como tratamiento definitivo del cáncer clínicamente localizado.

En tercer lugar la introducción de modelos de investigación celular con ratas Dunning, junto al desarrollo de técnicas de cultivo celular, ha proporcionado clonas de células cancerígenas, genéticamente estables, con comportamientos celulares distintos, correspondientes a diferentes tipos de células epiteliales prostáticas, que permiten el análisis comparativo y la identificación de factores individuales que condicionan diversos aspectos en el comportamiento y el fenotipo de las células neoplásicas.

Estos tres factores, se suman a los recientes avances en técnicas de biología celular y molecular que están permitiendo desvelar elementos fundamentales de la etiopatogenia del cáncer prostático. Por todo ello, el cáncer de próstata representa en la actualidad una de las principales líneas de investigación oncológica, clínica y básica.

1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.

El cáncer prostático constituye una de las neoplasias malignas más frecuentes en el hombre a nivel mundial, siendo su prevalencia del 30- 50% en varones mayores de 50 años, y aumentando de forma progresiva hasta el 80% a los 80 años (Foster y col., 1999). En los Estados Unidos es el cáncer más frecuente, con la aparición de 179.300 nuevos casos en 1999 (Landis y col.,1999) (Wingo y col., 1997).

El cáncer de próstata representa la segunda causa de muerte por cáncer en el sexo masculino, tras el cáncer de pulmón, sobrepasando a este mismo en incidencia en la población general. La mortalidad estimada en EUA fue de 37.000 muertes en 1999 (Landis y col.,1999). En la Unión Europea se diagnostican alrededor de 85.000 nuevos casos por año, con una previsión para el año 2020 de 118.000 nuevos casos (Parker y col., 1996).

En las últimas décadas se ha observado un aumento en la incidencia y la mortalidad del cáncer de próstata con un pico máximo en la incidencia entre 1989 y 1992 (Hsing y col., 2000). Entre 1991 y 1995 se ha constatado una disminución en el índice de mortalidad, a pesar de un creciente envejecimiento de la población (Hankey y col., 1999).

En la última década, a partir de 1990, se ha observado sin embargo un cambio en la incidencia, atribuible en parte, a la introducción de programas de diagnóstico precoz, con la introducción de nuevas técnicas como el antígeno prostático específico sérico (PSA), y la ultrasonografía prostática con biopsia dirigida (Brawer y col., 1992) (Catalona y col., 1991) (Gohagan y col., 1994) (Oesterling y col., 1988).

Estos hechos han supuesto un aumento en el diagnóstico de tumores clínicamente localizados potencialmente curables de hasta el 60%.

A pesar de ello, existe todavía una proporción significativa de pacientes que en el momento del diagnóstico inicial presentan ya una enfermedad diseminada.

El cáncer de próstata es mucho más frecuente en países del mundo industrializado. Se observa una mayor incidencia en la población de raza negra de los EUA, seguidos de los individuos de raza blanca del mismo país. Por otro lado los habitantes emigrados a los EUA de raza asiática muestran una menor incidencia (ver tabla 1).

El Norte de Europa, Canada, Australia y Francia, son también países de alto riesgo, mientras que Dinamarca, el Reino Unido, Italia y España son países de riesgo intermedio. Por último los países con menor incidencia corresponden al Sudeste asiático y África (Borras y col., 1992).

La siguiente tabla resume la incidencia y mortalidad del cáncer de próstata a nivel mundial (Hsing y col., 2000) :

| Riesgo | PAIS | INCIDENCIA 1973-1977 | INCIDENCIA 1988-1992 | MORTALIDAD 1973-1977 | MORTALIDAD 1988-1992 |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Alto riesgo | EUA (negros,SEER*) | 79.9 | 137.0 | 27.6 | 34.3 |
| | EUA (blancos,SEER*) | 47.9 | 100.8 | 13.4 | 15.7 |
| | Canada (BC) | 39.8 | 84.9 | 14.3 | 17.0 |
| | Suecia | 44.4 | 55.3 | 21.6 | 20.8 |
| | Australia (NSW) | 28.4 | 53.5 | 15.6 | 17.9 |
| | Francia (Bas-Rhin) | 23.0 | 48.1 | 15.0 | 17.1 |
| Riesgo medio | Dinamarca | 23.6 | 31.0 | 13.5 | 18.6 |
| | Reino Unido (s. Thames) | 20.1 | 29.3 | 12.1 | 16.8 |
| | Italia (Varese) | 22.8 | 28.2 | 10.5 | 11.5 |
| | España (Navarra) | 17.6 | 27.2 | 12.4 | 13.1 |
| Bajo riesgo | Israel (judíos) | 15.5 | 23.9 | 7.5 | 9.0 |
| | Singapur (chinos) | 4.8 | 9.8 | 1.9 | 3.7 |
| | Japón (Miyagi) | 4.9 | 9.0 | 2.4 | 3.8 |
| | Hong Kong | 5.1 | 7.9 | 2.1 | 2.8 |

Tabla 1. Incidencia y mortalidad en el carcinoma de próstata en las distintas poblaciones representativas a nivel mundial. Entre paréntesis figura la población a partir de la cual se ha determinado la incidencia. BC: British Columbia, NSW: New South Wales.

*Los valores son por 100.000 personas-año, con edad ajustada al estándar mundial (Hsing y col., 2000). * La base de datos SEER (comprobada el 14 de Marzo del 2003)*

El incremento en la incidencia del cáncer de próstata en los últimos años ha sido más pronunciado en países de alto riesgo, como EUA, Canadá y Australia (incremento del 25-114%), y en países de bajo riesgo asiáticos (incremento del 15-104%). Mientras que los países de riesgo intermedio se ha observado un ligero incremento en la incidencia (incremento del 25-55%) (Hsing y col., 2000). Las diferencias en la incidencia entre países de alto y bajo riesgo se ven afectadas por la realización de pruebas de screening en la población masculina, por la calidad del diagnóstico precoz con la interpretación de las biopsias por sextantes y por el registro de los casos de cáncer prostático, aumentando así la incidencia en los países de alto riesgo.

El aumento de la incidencia en los países asiáticos algunos autores lo han atribuido a los cambios en el estilo de vida de la población, con la aparición de factores de riesgo potenciales, como una dieta rica en grasas, obesidad y disminución en la actividad física.

La mortalidad por cáncer de próstata en estos países asiáticos ha aumentado de forma llamativa respecto a los países de alto riesgo, explicable por los programas de screening implementados en países de alto riesgo que permiten una detección precoz del cáncer de próstata, aumentando así la supervivencia.

Si se estudia el índice de mortalidad-incidencia en el periodo 1988-1992, en los distintos países, se observa que la mayor disminución en esta relación corresponde a la población blanca de EUA. Mientras que Francia, Dinamarca y Inglaterra muestran por el contrario los índices más elevados. Globalmente este índice ha disminuido en las últimas décadas debido a un aumento en la incidencia del cáncer de próstata.

En España la incidencia del carcinoma prostático, según el registro del Departamento Nacional de Estadística y Epidemiología de la Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer, se situaría en cuarto lugar respecto al cáncer de pulmón, cáncer de piel no melanoma, y del cáncer colo-rectal. En los últimos años ha superado en frecuencia al cáncer de vejiga urinaria y de laringe (Zubiri y col., 1995-1996).

Referente a la mortalidad, según el Centro Nacional de Epidemiología y Estadística, en el año 1997 se produjeron en España 5.460 defunciones por cáncer de próstata, representando un 9,9 % del total de cánceres. La edad media en el momento de la defunción fue de 74,7 años.

El cáncer de próstata es en nuestro país la tercera causa de defunción por cáncer, después del cáncer de pulmón y del cáncer colo-rectal. Estos datos están muy por debajo de los obtenidos en EUA, como se refleja en la tabla anterior (tabla 1). Así, la mortalidad por 100.000 habitantes-año en el periodo de 1988-1992 fue de 34,3 en la raza negra y del 15,7 en la raza blanca, comparado con el 13,1 obtenido en el registro de Navarra en el mismo periodo (Hsing y col., 2000).

En Cataluña las estadísticas del Registre poblacional del Càncer a Tarragona (RCT) desde 1980 observan que el carcinoma prostático representa el quinto tumor más frecuente, después del cáncer de pulmón, de piel no melanoma, colo-rectal, y de vejiga urinaria. Constituye el 10,9 % de los cánceres en el varón. Se presenta alrededor de los 50 años, aumentando su incidencia de forma progresiva a partir de los 65 años, para llegar a triplicarse en los grupos de edad más avanzada. Así, la mediana de edad en el momento del diagnóstico es de 74,3 años. A diferencia de otros registros, en el RCT, el carcinoma prostático no ha experimentado un incremento significativo en los últimos años (Izquierdo y col., 2000).

Las tasas de mortalidad observadas en Cataluña son similares a las observadas en Europa, así la mortalidad en Cataluña por 100.000 habitantes en el año 1992 fue de 14,1. No se observado en los últimos años cambios significativos en la evolución de la mortalidad ni un patrón de distribución geográfica definido en el cáncer prostático.

1.2- EPIDEMIOLOGÍA DE LA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL DE ALTO GRADO.

La neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN AG) está ampliamente aceptada como lesión precursora del adenocarcinoma prostático (Bostwick, 1995). Esta evidencia se basa en numerosos estudios histológicos, inmunohistoquímicos y genéticos (Sakr y col., 1993) (Perlman y col., 1990) (Nagle y col., 1991).

El PIN de alto grado a diferencia del PIN de bajo grado sin significado clínico, tiene una gran importancia por su alto valor predictivo como marcador de adenocarcinoma. Es un marcador de alto riesgo y su identificación en biopsias prostáticas obliga a la búsqueda de neoplasia (Park y col., 1989) (Markham y col., 1989) (Berner y col., 1993).

Respecto a la epidemiología del PIN, se ha observado que la prevalencia del PIN de alto grado es muy variable dependiendo del tipo de muestra tisular evaluada, la cohorte estudiada, los criterios diagnósticos empleados, y el procesamiento de las muestras.

En la reunión de trabajo de la OMS celebrada en Estocolmo el año 2000 (Sakr y col., 2000) se revisó la epidemiología del PIN a nivel mundial, constatándose una oscilación importante en la incidencia según las series de población y el tipo de muestras estudiadas.

Así, en las biopsias por aguja en Europa la prevalencia del PIN de alto grado oscila entre el 0,7 y el 15,2 con una media del 9,1, en EUA la prevalencia es mayor oscilando entre el 2,3 y el 16,5 con una media del 8,0, mientras que en los países asiáticos disminuye a una prevalencia media del 3,8.

En una revisión de 330 biopsias con aguja realizada por The American Cancer Society National Cancer Detection Project, se cifró la incidencia del PIN de alto grado en un 5,2% (Mettlin y col., 1991), mientras que en un estudio de Bostwick y col. se alcanzó una incidencia del 16,5% (Bostwick y col., 1995).

Un trabajo reciente con el mayor número de biopsias por aguja publicado (n= 132.426) realizado en EUA, evidenció una incidencia de PIN de alto grado del 3,7% (O'Dowd y col., 2000).

Esta variabilidad en los resultados puede explicarse por tratarse de estudios retrospectivos donde posibles PIN AG focales hubieran pasado desapercibidos, o diferencias en el método de muestreo tisular o poblacional de pacientes.

En Cataluña, un estudio sobre el PIN de alto grado en biopsias por aguja en el periodo 1990-1997, reveló una incidencia del 4,4%; porcentaje muy inferior al observado en otros países europeos y EUA que los autores atribuyen a factores geográficos locales o al escaso tiempo de seguimiento (Algaba y col., 1999).

En cuanto a la incidencia del PIN AG en las RTUPs y piezas de adenomectomía es relativamente infrecuente, y se asocia con un riesgo aumentado de desarrollar adenocarcinoma prostático. Los adenocarcinomas encontrados accidentalmente en los especímenes de RTUP suelen ser bien diferenciados, pequeños y con posibilidad de ser resecados completamente en el procedimiento.

En EUA la prevalencia varía entre el 2,3 y el 4,2%. Para Guadin (1997) la incidencia del PIN AG en RTUP es del 3,2%, desarrollando carcinoma el 22%. Para Pacelli y Bostwick (1997) la incidencia fue del 4,2%, con carcinoma asociado en el 10,2%, con Gleason intermedio en la mayoría de los casos. En cambio, en algunas series europeas de países nórdicos y en un estudio italiano aumenta hasta el 60%.

En nuestro país, la incidencia del PIN de alto grado fue del 17 % en biopsias por aguja, mientras que en RTUPs fue del 10,1% (Regueiro y col., 2000).

En cuanto a la incidencia del PIN de alto grado en piezas de prostatectomía radical, numerosos estudios constatan una alta prevalencia que oscila según las series de población. Así, en EUA Quian y Bostwick encuentran una prevalencia del 87%, y Maygarden del 79 % (1994), mientras que en nuestro medio el estudio anteriormente citado (Regueiro y col., 2000) cifra una incidencia del PIN de alto grado en el 50% de los casos.

Por último, la prevalencia del PIN de alto grado en series autópsicas es variable, situándose en Europa alrededor del 48,1% y en EUA del 44,6% (Sakr y col., 2000).

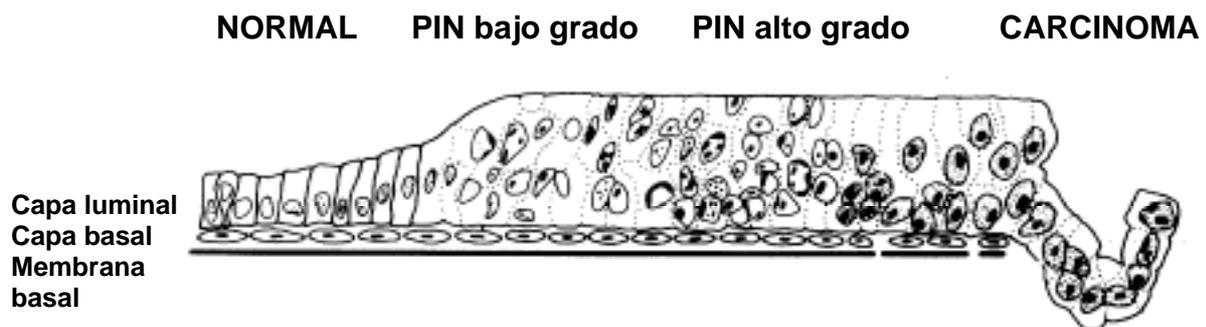
1.3- LESIONES PRECURSORAS DEL CÁNCER PROSTÁTICO.

1.3.1- Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN).

La neoplasia intraepitelial prostática (PIN) se define como una proliferación intraluminal del epitelio secretor del sistema ducto-acinar prostático.

Se caracteriza por un espectro de atípicas citológicas que van desde mínimas desviaciones de la normalidad, a una atípica citológica severa, indistinguible de la presente en el adenocarcinoma ya establecido; encontrando siempre una capa de células basales que rodea, de forma más o menos continua, dicha proliferación intraductal-acinar (Montironi y col., 2000).

Figura 1. Esquema sobre la carcinogénesis en la próstata humana. Se observa un continuo morfológico desde el epitelio prostático normal a los distintos grados de displasia epitelial, PIN 1, 2 y 3 , hasta llegar al carcinoma microinvasor inicial. Modificado de Bostwick DG y Brawer MK (1942).



Las primeras referencias a esta lesión las encontramos en Orteil (1926) y Andrews (1949). En 1965 McNeal hace énfasis en el posible papel pre-maligno de esta lesión proliferativa, y en 1986 con Bostwick describe los criterios diagnósticos para su identificación. Ambos autores usaban el término de “displasia intraductal” para referirse a dicha lesión; que subdividían en tres grados: displasia leve, moderada y severa.

El término de PIN fue propuesto en 1989 por Bostwick y Brawer en una reunión de trabajo sobre lesiones pre-neoplásicas patrocinada por The American Cancer Society. En esta conferencia se sustituyó la clasificación de PIN 1,2 y 3, por la denominación de PIN de alto grado para hacer referencia al antiguo PIN 2 y PIN 3, y PIN de bajo grado para sustituir al PIN 1.

1.3.1-a. CRITERIOS HISTOLÓGICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL PROSTÁTICA.

La diferenciación entre PIN de bajo grado y PIN de alto grado se basa en criterios citológicos. El núcleo de las células que componen el PIN de bajo grado está agrandado, es de tamaño variable, muestra una textura cromatínica ligeramente alterada, y nucleolo ausente o pequeño (Fig. 2).

El PIN de alto grado se caracteriza por células de núcleo agrandado, de tamaños relativamente uniformes, cromatina gruesa de distribución irregular, y nucleolo prominente, similar al observado en el carcinoma (Fig.3).

La capa de células basales está intacta en el PIN de bajo grado o raramente interrumpida, mientras que en la lesión de alto grado es frecuentemente discontinua. Con la progresiva indiferenciación celular se ha observado una pérdida cada vez mayor de células basales, lo que facilita la extensión estromal de la lesión y su transformación en carcinoma invasor (Fig.4).

A pesar que las características citológicas de la lesión de PIN de alto y bajo grado son bastante constantes, la arquitectura de estas lesiones muestra un espectro morfológico variable, desde un epitelio plano, a una florida proliferación celular cribiforme. Bostwick y col. describieron cuatro patrones fundamentales, que frecuentemente coexisten: plano, ondulado, micropapilar y cribiforme. El patrón ondulado (en inglés "tufting") es el más frecuente, y se observa en el 87% de los casos.

El reconocimiento de estos patrones arquitecturales facilita el diagnóstico del PIN, pero carece de relevancia clínico-patológica.

Existen otras formas inusuales de PIN como la diferenciación mucinosa, que incluye la variante de “células en anillo de sello”, y neuroendocrina de célula pequeña (Reyes y col. 1997), así como con células espumosas (Berman y col. 2000). Todos se observaron en la próstata periférica. El patrón de células en anillo de sello y el neuroendocrino de célula pequeña mostraban una morfología idéntica al carcinoma asociado. La existencia de estos tipos celulares en la lesión de PIN y el carcinoma asociado, proporciona evidencias sobre la relación cercana entre el PIN de alto grado y las diferentes variantes del carcinoma prostático.

1.3.1-b . DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL PIN.

En el diagnóstico diferencial del PIN hemos de tener en cuenta procesos benignos y malignos. Algunos procesos benignos pueden mostrar una marcada atíпия citológica debido a la inflamación, infartos, radicaciones, o diferentes grados de proliferación celular, como la hiperplasia de células basales, o cribiforme de células claras.

En los procesos malignos, es de ayuda detectar la pérdida de inmunoexpresión de citoqueratinas de alto peso molecular (34βE12) para confirmar la ausencia de células basales, y distinguir entre lesiones de PIN de alto grado y el carcinoma invasor (Figura 5) .

Hay que diferenciar la lesión de PIN de alto grado de la invasión intraductal o intra-acinar del carcinoma prostático, que se caracteriza por la presencia de masas de células malignas que rellenan la luces de conductos y acinos, sin contactar con las células basales (McNeal, 1996).

1.3.1-c. IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO DEL PIN DE ALTO GRADO.

Existen diversas evidencias que relacionan al PIN de alto grado con el carcinoma prostático. Entre ellas las más destacables son:

- La incidencia del PIN y del carcinoma prostático aumentan con la edad del paciente.
- Existe un incremento de la frecuencia, severidad, y extensión del PIN cuando se asocia al cáncer prostático.
- Tanto el PIN como el carcinoma prostático son lesiones multifocales que afectan fundamentalmente a la zona periférica de la glándula prostática.
- Puede observarse, desde un punto de vista morfológico, una transición entre al PIN de alto grado y el carcinoma.
- El PIN de alto grado comparte diversas alteraciones genéticas con el adenocarcinoma prostático.

Diversos autores han observado un incremento en la incidencia del PIN con la edad y la asociación al cáncer prostático. Bostwick y Brawer observaron que la frecuencia del PIN era significativamente mayor en próstatas que mostraban carcinoma. McNeal y Bostwick evidenciaron que el PIN afectaba un 82% de piezas de prostactomía post-mortem con adenocarcinoma prostático, mientras que tan sólo se observaba PIN en el 43% de las próstatas benignas. La relación del PIN de alto grado con respecto al adenocarcinoma la demostró ya McNeal (1991), en un estudio en el que evidenció focos de microinvasión en casos de displasia ducto-acinar severa, con cambios en la textura cromatínica de los núcleos graduales entre la lesión de PIN y el carcinoma ya establecido. La mayoría de lesiones de PIN de alto grado afectan a la zona periférica prostática, así como los carcinomas moderadamente y escasamente diferenciados. Diversos estudios han constatado que el 63% de focos de PIN de alto grado se localiza en la zona periférica, un 36% afectan simultáneamente a la zona periférica y de transición, mientras que tan sólo el 1% se localizan exclusivamente en la zona de transición (Epstein y col. 1990) (Quinn y col. 1990).

Es importante la distribución de las lesiones de PIN de alto grado, ya que un 72% de lesiones de PIN son multifocales en piezas de prostatectomía con carcinoma, afectando en un 63% a la zona periférica, en un 7% a la zona de transición, y en un 2% a ambas zonas (Quian y col., 1995).

Por otra parte, diversos estudios de inmunoexpresión, morfometría y biología molecular, han evidenciado una relación del PIN de alto grado con el adenocarcinoma prostático. Estos estudios demuestran un mayor índice de proliferación celular (Tamboli y col., 1996) y de apoptosis en el PIN y el carcinoma con respecto a la glándula normal (Bonkhoff y col., 1998).

En el PIN las células basales pierden su capacidad proliferativa, mientras que el epitelio secretor displásico aumenta su proliferación. Este fenómeno ha sido referido por algunos autores como "infidelidad topográfica" (Bonkhoff y col., 1996 y 1998).

Los desórdenes en la proliferación celular se acompañan de una expresión aberrante de oncogenes (erbB-2, erbB3 y c-met) y genes supresores tumorales (mm23-H1) (Myers y col., 1996) (Ware y col., 1994). Además, el PIN de alto grado muestra alteraciones en la regulación de la apoptosis. Así, el epitelio secretor transformado muestra expresión de oncoproteína supresora de la apoptosis Bcl-2 ((Bonkhoff y col., 1998). La expresión de Bcl-2 disminuye la expresión de receptores de andrógenos en el epitelio secretor del PIN, aumentando así su resistencia a la muerte por apoptosis dependiente de andrógenos (Bonkhoff y col., 1998).

En el epitelio prostático se observa en condiciones de normalidad la expresión del enzima glutatión transferasa-1 (GSTP-1) a nivel de las células basales, con funciones de protección del daño genómico, cuya expresión se induce ante situaciones de estrés celular. El enzima GSTP-1 está inactivo en más del 90% de carcinomas prostáticos (Lee y col., 1994 y 1997), y en el 70% de lesiones de PIN por un mecanismo de hipermetilación del promotor (Brooks y col., 1998).

Se ha postulado que las células del epitelio secretor que disminuyan la expresión de GSPT-1 serían diana para posibles alteraciones genéticas y posterior transformación neoplásica.

Por otro lado, existen alteraciones genéticas comunes entre en PIN y el carcinoma. Las principales son: ganancias en el cromosoma 7, particularmente el 7q31, pérdida del 8p y ganancia del 8q, y pérdidas en 10q, 16q, y 18q (Qian y col., 1996) (Akers y col., 1995) (Bergenheim y col., 1991) (Bova y col., 1993) (Cunnigham y col., 1996) (Emmert-Buck y col., 1995) (MacGrogan y col., 1994) (Qian J., 1995).

Por todo ello es importante el diagnóstico del PIN de alto grado en biopsias por aguja, ya que el tratamiento radioterapéutico y la deprivación androgénica parecen disminuir la prevalencia y la extensión del PIN (Bostwick, 1999). En un futuro se plantearía la posibilidad de un tratamiento de quimioprevención en los pacientes afectados de PIN en las biopsias por sextantes sin carcinoma asociado.

1.3.2- HIPERPLASIA ADENOMATOSA ATÍPICA (HAA).

La hiperplasia adenomatosa atípica (HAA) consiste en una proliferación acinar constituida por glándulas de pequeño-mediano calibre, que forman un nódulo bien circunscrito, frecuentemente situado en la zona de transición prostática en relación a una zona de hiperplasia glandular benigna (McNeal, 1965) (Gleason, 1985).

Su aspecto bien delimitado y no invasivo puede simular un adenocarcinoma prostático bien diferenciado con grado de Gleason 1 y 2. A diferencia del carcinoma la HAA no muestra nucleolo prominente y conserva una capa de células basales que puede ser discontinua (Bostwick y col., 1993).

En 1965 McNeal describió esta lesión en series autópsicas, y la relacionó con el adenocarcinoma de bajo grado originado en la zona de transición.

Brawn y col. observaron que un 6,4% de pacientes con HAA desarrollaban carcinoma, comparado con un 3,7% en los pacientes que mostraban una hiperplasia prostática benigna, con un seguimiento de 5 a 15 años.

La HAA ha sido identificada entre un 1,5 a 19,6% de RTUs, y hasta en un 33% de piezas de prostatectomía (Bostwick y Qian, 1995). Por otro lado, es una lesión que no suele encontrarse en biopsias por aguja (<2%) que no están dirigidas a la zona de transición prostática.

Diversos estudios demostraron en la HAA unos índices de proliferación intermedios entre la hiperplasia prostática benigna y el adenocarcinoma de bajo grado utilizando marcadores de proliferación celular (MIB-1/Ki67, PCNA); mientras que el PIN muestra índices de proliferación celular más cercanos al adenocarcinoma moderadamente diferenciado (Helpap y col., 1995) (López-Beltrán y col.1996).

Por otro lado, Cheng y Bostwick (1998) demostraron alteraciones genéticas en el 47% de HAA analizadas, localizadas en los cromosomas: 7q31-35, 8p12-21, 8q22.2 y 18q12.2. Otros estudios han demostrado pérdidas alélicas situadas en las mismas regiones que las lesiones de PIN y de adenocarcinoma. Concretamente, la pérdida en el cromosoma 8p es un hecho frecuente tanto en el PIN y como en el carcinoma prostático.

Estudios moleculares y fenotípicos recientes sugieren que en algunos casos existiría una relación entre la HHA y el cáncer prostático (Doll y col., 1999) (Yang y col., 2002).

Estos resultados apoyarían un papel de la HAA como lesión precursora de algunos cánceres prostáticos, y por tanto algunos autores sugieren que la HAA se debería considerar una lesión pre-neoplásica. Otros autores defienden que la asociación entre el carcinoma prostático de la zona de transición y la HAA es simplemente circunstancial, tratándose de un epifenómeno (Amin y col., 1993). En definitiva, los datos obtenidos son insuficientes para llegar a una conclusión sobre la naturaleza premaligna de la HAA, ya que no se ha podido documentar de forma feaciente una transición directa entre dicha lesión y el adenocarcinoma prostático.

1.3.3- OTRAS LESIONES MORFOLÓGICAS.

1.3.3.a- HIPERPLASIA PROSTÁTICA POST-ATRÓFICA (HPA).

En 1954 Franks consideró a un subtipo de hiperplasia post-atrónica (“*sclerotic atrophy with hyperplasia*”) como posible lesión precursora del cáncer prostático, dada su íntima asociación con algunos casos de adenocarcinoma. Franks consideró la lesión como de naturaleza proliferativa.

Posteriormente, Liabag en 1968 demostró una asociación topográfica entre la HPA y el carcinoma prostático. Más tarde, esta idea fue abandonada con la identificación de la neoplasia prostática de alto grado como lesión precursora del adenocarcinoma prostático.

La hiperplasia prostática post-atrónica consiste en una dilatación de conductos y acinos prostáticos junto a zonas de proliferación de glándulas de pequeño tamaño, de aspecto atrófico. Pueden observarse núcleos aumentados de tamaño con nucleolos prominentes, simulando al adenocarcinoma prostático, siendo importante el diagnóstico diferencial en biopsias por aguja por sus posibles implicaciones terapéuticas.

Algunos autores sugieren que las lesiones proliferativas post-atrofia podrían ser lesiones pre-neoplásicas, que desarrollarían áreas de carcinoma directamente, o indirectamente a través de su transformación en lesión intraepitelial; ya que se ha podido constatar como en zonas de atrofia de la próstata periférica surge directamente el PIN de alto grado.

Un estudio reciente de Shah y col.(2001) describe alteraciones genéticas en áreas de hiperplasia post-atrónica que caracterizan a la lesión de HGPIN y al carcinoma prostático. Concretamente un 6% de lesiones de PAH mostraban ganancias de la región centromérica del cromosoma 8, detectadas mediante técnicas de hibridación de interfase fluorescente (FISH).

Finalmente Macoska y col. (2000) han identificado recientemente pérdidas alélicas en el cromosoma 8p22, y ganancias en la región centromérica en 7 casos de atrofia prostática mediante técnicas de FISH.

1.3.3.b- ATROFIA INFLAMATORIA PROLIFERATIVA (PIA).

De Marzo y col. (1999) estudiaron el papel de la atrofia inflamatoria proliferativa (PIA) como lesión precursora del cáncer de próstata. Definieron con este término a una lesión caracterizada por focos de proliferación epitelial glandular en el contexto de una zona de atrofia prostática con marcada inflamación estromal. La clave de esta lesión proliferativa es la presencia de dos capas celulares, y un infiltrado inflamatorio linfocitario y de polimorfonucleares, tanto a nivel estromal como epitelial, acompañado de fibrosis del estroma.

Las características morfológicas de la PIA se corresponden con la “atrofia inflamatoria” descrita por McNeal (1997), y la prostatitis crónica descrita por Bennett y col. (1993).

De Marzo y col. observaron un aumento en la expresión de marcadores de proliferación celular (MIB-1, Ki67), y en la expresión de Bcl-2 con respecto al epitelio benigno y a la atrofia simple, y detectaron además en todos los casos de PIA la expresión del enzima detoxificante celular de fase II GSTP-1 (Glutación S-transferasa de clase π). La expresión de este enzima en todos los casos de PIA sugiere una respuesta celular inducida por las sustancias liberadas por la inflamación acompañante. Así mismo, se observó una disminución en la inmunexpresión de la proteína inhibidora de la quinasa-dependiente de ciclinas p27 (Kip 1).

No obstante, no existen datos concluyentes sobre la naturaleza pre-maligna de estas lesiones.

1.4- ETIOPATOGENIA DEL CÁNCER PROSTÁTICO.

Las causas responsables del desarrollo del cáncer prostático son desconocidas, y no existen datos concluyentes en referencia a la incidencia de los diversos factores desencadenantes.

De los diversos factores estudiados la edad, la raza, la historia familiar y, posiblemente, el contenido en grasa de la dieta, se perfilan como los principales factores de riesgo con relación al cáncer de próstata.

1.4.1- EDAD.

La incidencia del cáncer prostático se incrementa de forma importante con la edad. Debido al envejecimiento progresivo de la población, en la próxima década se espera un aumento dramático en el número de casos de cáncer de próstata (Carter y col., 1990).

La probabilidad de desarrollar un cáncer prostático a lo largo de la vida se cifra en un 16 %. El cáncer prostático es responsable de alrededor del 3% de todas las muertes en individuos mayores de 55 años (Seidman y col., 1985), mientras que la prevalencia de esta neoplasia a los 80 años llega alrededor del 80 % (Van Brussel y col., 1999). Por tanto, la mayoría de pacientes mueren “con su cáncer de próstata”, más que “por un cáncer de próstata”. Esto es debido a la elevada prevalencia de carcinomas prostáticos “latentes”, que suelen ser de menor volumen, grado tumoral y agresividad. Estos carcinomas no suelen producir enfermedad clínicamente detectable, y se han observado ya en una población menor de 50 años.

Un estudio llevado a cabo a partir de 152 piezas de cistoprostatectomía en varones entre 10 y 49 años (Sakr y col., 1993) demostró una incidencia sorprendentemente elevada de PIN y adenocarcinoma. Así, se evidenció PIN en el 0%,9%,20% y 44%, y adenocarcinoma incidental en el 0%, 0%, 27%, y 34% de individuos en la segunda, tercera, cuarta, y quinta década respectivamente. Curiosamente, aunque todas las lesiones de PIN de alto grado se hallaron en la zona periférica prostática con adenocarcinoma coexistente, tan sólo en un caso se observó lesión de PIN cercana o en contigüidad al adenocarcinoma.

Los autores sugieren, que algunos adenocarcinomas latentes o microscópicos tendrían acontecimientos patogénicos diferentes de los adenocarcinomas detectados clínicamente, desarrollándose independientemente de la lesión de PIN, y con un comportamiento más indolente.

Mc Neal ya apuntó en 1986 que estos adenocarcinomas latentes o microscópicos no son inherentemente diferentes a los detectados clínicamente. Suelen ser adenocarcinomas de pequeño tamaño, bien diferenciados, que representarían una fase precoz del desarrollo tumoral. Así, en un estudio a partir de 100 casos de prostatectomías autopsicas concluye que el carcinoma incidental descubierto en la autopsia, el carcinoma detectado clínicamente, y el carcinoma metastásico, representan diferentes fases de un continuo biológico en un mismo tipo de adenocarcinoma.

En esta línea, Kabalin y col. (1989) en un estudio de 66 casos de cistoprostatectomía radical sin evidencia de carcinoma prostático preoperatorio, evidenciaron un 38% de casos con adenocarcinoma incidental. La media de volumen tumoral fue de 0,11cc, y en ningún caso se observó un grado de Gleason superior a 4 o 5.

El periodo asintomático o de latencia en el cáncer prostático se ha estimado en 11-12 años para individuos de raza blanca, y de 10-11 años para la población de raza negra (Etzioni y col., 1998).

Por debajo de los 50 años, el carcinoma prostático es infrecuente. Tan sólo afectaría a un 1 o 4 % de la población, según las series (Smith y col., 2000). Estudios anteriores a la era del PSA, apuntaban un peor pronóstico para estos pacientes, presentando en el momento del diagnóstico con enfermedad localmente avanzada o incluso con metástasis a distancia. Pero estudios más recientes han revelado un mejor pronóstico, debido a la detección precoz de la enfermedad, en un estadio localizado.

Por otro lado, el cáncer de próstata es extremadamente raro en la tercera década de la vida, aunque se han reportado casos aislados incluso en niños (Culkin y col., 1986). Estos casos mostraban baja o nula supervivencia, con neoplasias pobremente diferenciadas presentando frecuentemente metástasis en el momento del diagnóstico.

Por último, diversos trabajos han analizado la posible relación entre la edad paterna al nacimiento de un determinado individuo y su posterior riesgo a desarrollar un cáncer de próstata, obteniéndose resultados contradictorios (Janerich y col., 1989). En un estudio reciente llevado a cabo con datos procedentes del estudio Framingham, se ha evidenciado que existe un riesgo significativamente mayor de desarrollar un adenocarcinoma prostático en individuos nacidos de padres en edades relativamente avanzadas, mientras que la edad materna no es aparentemente un factor de riesgo (Zhang y col., 1999).

1.4.2- FACTORES RACIALES.

Existen diferencias entre los diferentes grupos étnicos respecto al riesgo de desarrollar cáncer prostático. Así, la mortalidad de los hombres afro-americanos es superior a la de la población de raza caucásica, y excede ampliamente a la de los hombres de raza negra residentes en África (Parker y col., 1998) (Guo y col., 2000).

Por otro lado, los residentes en EUA procedentes de países asiáticos muestran una menor mortalidad respecto a los caucásicos. A pesar de las diferencias en el comportamiento clínico de la enfermedad entre los distintos grupos raciales, no se han detectado un mayor número de carcinomas en la raza negra en estudios autópsicos (Breslow y col., 1977).

Estudios epidemiológicos sobre migración muestran como la población japonesa residente en EUA adquiere en la segunda o tercera generación un riesgo similar a la población nativa de desarrollar cáncer de próstata (Parker y col., 1998). Por otro lado, la población jamaicana de EUA muestra un aumento del riesgo a padecer cáncer prostático respecto a sus compatriotas no emigrados (Glover y col., 1998).

Se han evidenciado polimorfismos genéticos asociados a grupos raciales.

Ciertas variaciones alélicas del gen del receptor de la vitamina D presentes en la población afro-americana demostraron un aumento en la incidencia de carcinoma prostático en estadios más avanzados (Ingles y col., 1998).

Otro factor de riesgo estaría en relación con los receptores de andrógenos. Los trinucleótidos microsatélites llamados “secuencias de repetición CAG” se encuentran situadas en la región N-terminal del receptor de andrógenos, y participarían en la regulación de la transcripción. Se ha comprobado una relación inversa entre el número de secuencias de repetición y el riesgo de carcinoma prostático. En la raza negra se han detectado un menor número de secuencias, mientras que la raza asiática muestra el mayor número de secuencias de repetición (Giovanucci y col., 1997).

En un estudio reciente se plantea que factores no biológicos de tipo socio-económico podrían contribuir a las diferencias observadas en el riesgo de desarrollar cáncer prostático entre las diferentes razas. Los autores concluyen que no explicarían las diferencias en la incidencia y supervivencia evidenciadas entre los diferentes grupos étnicos (Robbins y col., 2000).

1.4.3- FACTORES GENÉTICOS.

El carcinoma prostático hereditario es una variante de cáncer de próstata que representa el 9 % del total de carcinomas prostáticos (Carter y col., 1992). Se caracteriza por una edad de comienzo joven, curso clínico agresivo, independencia de factores dietéticos, ambientales o étnicos, y herencia autosómica dominante (Carter y col., 1994) (Lesko y col., 1996).

Estudios anatomopatológicos revelaron que algunos casos de carcinoma de próstata hereditario eran de grado inferior a su homólogo esporádico, sin observarse otras diferencias clínicas ni patológicas (Keetch y col., 1996).

Estudios de ligamiento genético para mapear los genes específicos involucrados en el carcinoma prostático, han permitido identificar 4 locis de susceptibilidad aumentada para el cáncer de próstata hereditario (Karayi y col., 2000).

Sin embargo, no se ha conseguido correlacionar la tipología HLA haplotipo con el cáncer de próstata, lo que confirmaría las influencias genéticas en la génesis y desarrollo de la neoplasia.

El riesgo relativo de desarrollar un cáncer prostático en individuos con historia familiar de cáncer de próstata depende del grado de parentesco y del número de familiares afectados. Así, en individuos con parientes de primer grado el riesgo es el doble que la población sin historia familiar, y si son dos o más los parientes afectos el riesgo aumentaría de cinco a diez veces (Grönberg y col., 2000).

Además de la historia familiar, existen en el proceso de carcinogénesis prostática múltiples alteraciones genéticas que implican la pérdida de secuencias genómicas específicas que pueden estar relacionadas con la inactivación de genes supresores tumorales, y la ganancia de regiones cromosómicas específicas que podrían estar asociadas a la activación de oncogenes.

Las alteraciones genéticas en el PIN y el carcinoma invasor son las ganancias en el cromosoma 7, particularmente 7q31; la pérdida de 8p y ganancia del 8q; y la pérdida de 10q, 16q y 18q (Foster y col., 2000).

Por otro lado, se ha identificado un gen inductor de tumores prostáticos (PTI-1) que se expresa en líneas cancerígenas de próstata, en el carcinoma prostático y en el suero de algunos pacientes con cáncer prostático (Sun y col., 1997).

El gen BRAC1 situado en el cromosoma 17q21 involucrado en el cáncer de mama y de ovario, ha sido también implicado en el cáncer de próstata (Rosen y col., 2001). Se han identificado diversas actividades en la regulación de la proliferación celular, la reparación del ADN y en la inducción de la apoptosis, que sugieren un papel de BRAC1 como gen supresor tumoral implicado en el cáncer prostático.

Más recientemente, se ha identificado un nuevo gen: PTOV-1, ("prostate tumor overexpressed") que se sobreexpresa en fases iniciales y finales del cáncer prostático (Benedict y col., 2001).

1.4.4- FACTORES HORMONALES.

La testosterona y su principal metabolito, la dihidrotestosterona, son necesarios para el crecimiento y funcionamiento de la glándula prostática. Se han evidenciado concentraciones elevadas de testosterona, dihidrotestosterona, y androstendiona en tejidos de cáncer prostático respecto al tejido prostático normal (Glantz, 1964).

En diversos modelos animales se ha demostrado que la administración de grandes cantidades de andrógenos, es capaz de inducir el cáncer de próstata (Kasper y col., 1998). Además, no se desarrollan carcinomas prostáticos en pacientes castrados antes de la pubertad, o en pseudohermafroditas con deficiencias en el enzima 5α -reductasa (Young y col., 2000). Por otro lado, se ha documentado una reducción en el riesgo de desarrollar cáncer de próstata en enfermos cirróticos. Estos enfermos muestran un aumento en los niveles de estrógenos circulantes y unos niveles disminuidos de testosterona (Glantz, 1964).

Por otro lado, existen mutaciones en el gen que codifica el receptor de andrógenos (RA) en el 8 % de carcinomas de próstata detectados clínicamente (Marcelli y col., 2000), y también se han observado amplificaciones del gen RA en el 22 % de las metástasis por carcinomas prostáticos hormono-refractarios (Bubendorf y col., 1999).

La amplificación del gen RA se produce en pacientes que responden inicialmente a la terapia de deprivación androgénica, y posteriormente recaen. La amplificación del receptor estaría relacionado con el crecimiento de poblaciones de células tumorales sensibles a niveles bajos de andrógenos circulantes (Koivisto y col., 1997).

Estos hechos apoyan la hipótesis que el factor hormonal adquiere un papel fundamental en la etiopatogenia del cáncer de próstata.

1.4.5- FACTORES DIETÉTICOS.

Entre los diferentes factores de riesgo implicados en el cáncer prostático, los factores nutricionales parecen tener un papel fundamental, como lo demuestran las distintas incidencias de la neoplasia según su distribución geográfica (Schulman y col., 2000).

Diversos estudios epidemiológicos han apuntado que la etiología del cáncer prostático depende de factores medioambientales y genéticos. Así, se ha demostrado una baja incidencia de la neoplasia en los países asiáticos, donde la dieta es pobre en grasas animales y rica en fibra y en productos derivados de la soja. En cambio, en los países industrializados se observa un mayor consumo en grasas animales y menor en fibra y vegetales (Miller, 2000).

Estudios realizados en EUA sobre la población inmigrante de países asiáticos, procedentes de China y Japón, demostraron al cabo de unas generaciones, un aumento en la incidencia de cáncer prostático, equiparándose a la incidencia de la neoplasia observada en la población nativa (Muir y col., 1991) (Morton y col., 1998).

Entre los distintos factores dietéticos estudiados, parecen tener un papel fundamental el exceso en el aporte calórico y en el contenido en grasas animales de la dieta. Estudios recientes han revelado una posible relación entre el aporte energético de la dieta y el cáncer de próstata. Usando líneas celulares de tipo Dunning de cáncer prostático andrógeno- dependiente, y la línea andrógeno sensible LNCaP en ratones con inmunodeficiencia combinada, Mukherjee y col. (1999) observaron que la densidad vascular y la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular disminuían mediante una drástica restricción calórica y la castración. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que la restricción calórica reduce el crecimiento tumoral mediante la inhibición de la angiogénesis.

En un estudio de casos-controles el riesgo de padecer cáncer de próstata resultó hasta un 70 % mayor en individuos situados en el cuartil superior de consumo calórico respecto a los situados en el cuartil inferior (Rohan y col., 1995). Sin embargo, un estudio de cohortes realizado en Holanda por Schuurman y col. (1998) con 58.279 individuos de 55 a 69 años, no evidenció ninguna asociación entre el consumo calórico, contenido en grasas totales de la dieta, de ácidos grasos saturados y trans-insaturados, y el riesgo de cáncer prostático.

Diversos estudios en líneas celulares de cáncer de próstata han demostrado que el ácido araquidónico procedente de la grasa de origen animal, mediante su conversión a ácido 5-hidroxi-eicosatetranoico (5- HETE), es capaz de prevenir la muerte celular programada cuando se administra por vía exógena, y su disminución induce la apoptosis. Se ha postulado que la grasa de origen animal estimularía la producción de andrógenos, con la consecuente estimulación hormonal prostática, pudiendo incrementar el riesgo de aparición de tumores hormono-dependientes (Montironi y col., 1999).

Pero las interrelaciones con otros factores presentes en la dieta son complejas y difíciles de analizar mediante estudios de casos controles.

Los ácidos grasos poli-insaturados, en concreto el ácido linoleico, podría tener efectos nocivos sobre el DNA y sobre otros componentes celulares, reduciendo también la actividad del enzima 5α -reductasa (Montironi y col., 1999).. En cambio, los ácidos grasos Omega-3 han demostrado *in vitro* un efecto inhibitor sobre el crecimiento de diversas líneas celulares de cáncer de próstata, mediante la inhibición de la actividad proteolítica de enzimas implicados en la invasión tumoral (Pandali y col., 1996).

Otros micronutrientes y vitaminas estudiados en su posible implicación en el cáncer prostático son los carotenos, como el licopene, con actividad antioxidante (Krinsky, 1998) y la vitamina A, que inhibe la proliferación celular mediante la interacción con receptores nucleares implicados en el crecimiento y diferenciación celular (Peto y col., 1981) (Machlin y col., 1987).

Por último, diversos estudios han apuntado que productos derivados de la soja, tendrían un efecto beneficioso en la prevención del cáncer prostático, reduciendo los niveles hormonales de andrógenos, mediante una inhibición del enzima 5 α -reductasa. Principalmente los isoflavonoides, que han demostrado capacidad de inhibición de la angiogénesis en modelos animales, mediante la inhibición de la proliferación celular y de diversos enzimas que actuarían promoviendo el crecimiento celular, y estimulando la apoptosis (Bylund y col., 2000).

1.4.6- FACTORES AMBIENTALES.

El hecho de observar una mayor incidencia del cáncer prostático en los países industrializados, como EUA y los países nórdicos, y en la población urbana respecto a la rural, avala la importancia de los factores ambientales en la etiopatogenia de esta neoplasia (Sharma-Wagner y col., 2000).

Se han identificado varios componentes químicos, que actuando como promotores o directamente como carcinógenos, favorecerían el desarrollo de la enfermedad. Diversos estudios han apuntado la importancia del cadmio y los pesticidas como agentes carcinógenos humanos a nivel prostático (Kipling y col., 1977) (Morrison y col., 1992). Otras investigaciones han encontrado una relación ocupacional con el cáncer de próstata, como agricultores, trabajadores del metal, mecánicos, impresores, pintores, fontaneros, etc..., sin que se haya podido confirmar claramente su relación con la etiopatogenia tumoral (Flanders, 1984).

Por último, un elevado número de estudios epidemiológicos han intentado relacionar el tabaco con un aumento del riesgo de cáncer de próstata (Pour, 1983) (Nomura y col., 1991).

Actualmente, el hábito tabáquico no está considerado generalmente como factor de riesgo del cáncer prostático, aunque algunos estudios han reportado una asociación positiva (Colditz, 1996) (Mills y col., 1989) (Cerhan y col., 1997) (Hsing y col., 1991).

En otros trabajos tan sólo se ha observado una débil asociación entre el hábito tabáquico y una disminución en la supervivencia por cáncer de próstata (Rodríguez y col., 1997) (Coughlin y col., 1996).

1.4.7- MISCELÁNEA.

En la actualidad no existen datos concluyentes que relacionen diversos factores antropométricos (altura, peso, índice de masa corporal, y otros) con el riesgo de desarrollar cáncer de próstata (Calle, 2000). Se ha propuesto que las relaciones observadas en algunos estudios entre factores antropométricos y el cáncer de próstata, se explicarían por una interacción de factores hormonales, principalmente los andrógenos, y el factor de crecimiento insulínico (IGF), que han demostrado estimular el crecimiento de las células prostáticas normales y tumorales.

Existen estudios que han encontrado una asociación entre el hábito enólico y el riesgo a desarrollar cáncer de próstata (Hayes y col., 1996), pero los datos epidemiológicos disponibles actualmente no apoyan un papel etiológico de la ingesta de alcohol en el cáncer de próstata (Breslow y col., 1998).

La vasectomía ha sido otro factor de riesgo ya apuntado en relación con el cáncer de próstata. En 1984 un estudio prospectivo (Massey y col., 1984) estableció la posibilidad de una relación entre la vasectomía y el carcinoma prostático. Posteriormente se publicaron dos trabajos epidemiológicos retrospectivos significativos (Rosenberg y col., 1990) (Mettlin y col., 1990) que llevaron a la discusión del tema en paneles de expertos, sin que se hallaran resultados significativos adicionales que confirmaran dicha hipótesis.

Publicaciones recientes han demostrado una ausencia de relación significativa entre vasectomía y cáncer de próstata (Bernal y col., 1998) (Lesko y col., 1999).

Por último, los trabajos sobre el papel de diversos factores como la actividad física (Hackney, 1996) (Liu y col., 2000), el nivel socio-económico (Lund y col., 2000) (Harvei y col., 1997), la diabetes (Steeland y col., 1995) (Giovanucci y col., 1998), y agentes infecciosos como el papilomavirus y los herpesvirus (Serth y col., 1999) (Dillner y col., 1998) (Hisada y col., 2000) (Centifanto y col., 1973) no han podido demostrar una asociación con el carcinoma prostático.

1.5- FACTORES PRONÓSTICOS.

Los factores pronósticos se definen como las características de una enfermedad que nos permiten predecir la conducta biológica en un individuo determinado.

En el cáncer de próstata existen diversos factores que definen su naturaleza, como marcadores biológicos, factores relacionados con el grado y el estadio tumoral, y factores que permiten pronosticar la respuesta al tratamiento a corto plazo. Dependiendo de la evolución esperada un paciente puede ser tratado con intención curativa, con riesgo de producir una morbilidad yatrogénica considerable, o con intención paliativa, con la finalidad de mejorar la calidad de vida del paciente. Actualmente, existen dificultades para escoger el tratamiento óptimo en cada caso, debido a que es difícil predecir el comportamiento del tumor en cada caso de forma individualizada.

El uso de marcadores pronósticos puede por lo tanto ser crucial para identificar aquel subgrupo de pacientes con carcinomas prostáticos de comportamiento más agresivo respecto a los de comportamiento más indolente.

Los factores pronósticos actualmente se dividen en diferentes categorías, según sean factores con valor pronóstico demostrado y que deben ser incluidos en el informe anatomopatológico, o bien aquellos factores con posible valor pronóstico en fase de evaluación e investigación que todavía no se han demostrado como factores pronósticos independientes.

La clasificación en categorías de los factores pronósticos es fruto del consenso entre dos equipos multidisciplinares de médicos: el Colegio Americano de Patólogos (CAP) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), reunidos para la evaluación de los datos existentes en el cáncer de próstata (Bostwick y Foster, 1999) (Bostwick, 2000).

Tabla 2- Clasificación de los factores pronósticos del cáncer de próstata (Consenso de la CAP y de la OMS, 1999)

| | |
|--|---|
| <p>CATEGORÍA I: Factores con valor pronóstico demostrado, recomendados en el informe anatómo-patológico rutinario.</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Estadio Tumoral 2. Grado Histológico 3. Estado de los márgenes quirúrgicos 4. PSA 5. Efectos patológicos del tratamiento (OMS) 6. Localización anatómica del cáncer en la próstata (OMS) |
| <p>CATEGORÍA II: Factores con posible valor pronóstico que requieren de más evaluación para recomendar su uso. Se incluyen en esta categoría factores pronósticos recomendados con datos incompletos.</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Ploidía del ADN 2. Tipo histológico 3. Volumen tumoral (en biopsias por aguja y en piezas de prostatectomía radical) |
| <p>CATEGORÍA III: Factores con alguna evidencia científica que apoya su uso como factor pronóstico o diagnóstico, pero aún no recomendado. También se incluyen los factores de significado incierto.</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Antígeno de membrana prostático específico 2. Invasión perineural 3. Invasión vascular o linfática 4. Densidad microvascular 5. Factor transformante β, integrinas, etc... 6. Marcadores de proliferación celular y de apoptosis 7. Morfometría nuclear 8. Receptores androgénicos 9. Diferenciación neuroendocrina 10. Marcadores genéticos 11. Otros factores,... |

1.5.1- FACTORES PRONÓSTICOS DE CATEGORÍA I

1.5.1.1- Estadio Tumoral.

La correcta estadificación del cáncer prostático determinará la elección de la estrategia terapéutica más adecuada, permitiendo además la homogeneización de criterios clínico-patológicos que puedan determinar en última instancia casuísticas comparables.

El primer sistema de clasificación fue creado en 1956 por Whitmore, y posteriormente modificada por Jewet en 1975. Actualmente el Comité de la OMS recomienda la clasificación pTNM para la estadificación patológica. (Tabla-3) (Figura 6).

Los adenocarcinomas prostáticos en estadio T1 no son palpables ni visibles por técnicas de imagen confinados a la glándula prostática. Suelen detectarse en resecciones transuretrales (RTUs) con clínica de hiperplasia prostática benigna o por biopsia prostática aleatoria tras marcadores elevados (Figura 7).

El material resecado es limitado y generalmente no incluye representación de la zona periférica y apical. Así, el 92 % de los pacientes muestran carcinoma residual en la pieza de prostatectomía radical (Epstein y col., 1988).

Los pacientes en estadio T2 con adenocarcinomas órgano-confinados tienen un pronóstico excelente, con más del 90% libres de enfermedad a los 5 años (Wheeler y col., 1998).

Tabla 3- Clasificación TNM. 6º edición (2003).

(T: estadio local del tumor, N: afectación ganglionar, y M enfermedad metastásica)

| | |
|---|---|
| <p><u>ESTADIO LOCAL</u> (T:Tumor primario)</p> | <p>Tx : No se puede evaluar el tumor primario. To : No hay evidencia de tumor primario. T1 : Tumor no evidente clínicamente, no palpable ni visible por técnicas de imagen.</p> <ul style="list-style-type: none"> • T1a: Hallazgo histológico incidental en el 5% o menos del tejido resecado. • T1b: Hallazgo histológico incidental en más del 5% del tejido resecado. • T1c: Identificación por punción biopsia aleatoria/ marcadores elevados. <p>T2: Tumor limitado a la próstata.</p> <ul style="list-style-type: none"> • T2a: El tumor abarca la mitad de un lóbulo o menos. • T2b: El tumor abarca más de la mitad de un lóbulo, pero no ambos lóbulos . • T2c: El tumor abarca ambos lóbulos. <p>T3: Tumor que se extiende a través de la cápsula prostática.</p> <ul style="list-style-type: none"> • T3a: Extensión extracapsular (unilateral o bilateral) • T3b: Invasión de vesículas seminales. <p>T4: Tumor fijo o que invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales: cuello vesical, esfínter externo, recto, músculos elevadores del ano y/o pared pélvica.</p> |
| <p><u>AFECTACIÓN GANGLIONAR</u> (N: Ganglios linfáticos regionales)</p> | <p>Nx: No es posible evaluar los ganglios linfáticos regionales. No: Ausencia de metástasis ganglionar regional. N1: Metástasis en ganglios linfáticos regionales.</p> |
| <p><u>ENFERMEDAD METASTÁSICA</u> (M: Metástasis a distancia)</p> | <p>Mx: Metástasis a distancia no evaluable. Mo: Ausencia de metástasis a distancia. M1: Metástasis a distancia:</p> <ul style="list-style-type: none"> • M1a: Afectación de ganglios linfáticos no regionales. • M1b: Huesos. • M1c: Otras localizaciones. |

El adenocarcinoma prostático presenta extensión extraprostática hasta en el 90% según las series (Robinette y col., 1984). Los casos con infiltración capsular focal representan un grupo de pronóstico intermedio entre los casos órgano-confinados y los casos con afectación extraprostática extensa (Epstein y col., 1993) (Figura 8).

Por otro lado, se ha observado que los carcinomas prostáticos que invaden las vesículas seminales suelen tener un mal pronóstico y se asocian a tumores de alto grado, de gran volumen, con extensión extraprostática y metástasis ganglionares (Ohori y col., 1993).

La presencia de metástasis ganglionares en cadenas linfáticas obturadoras N1 afecta hasta un 40% de casos (Fowler y col., 1981), conlleva invariablemente hacia la progresión tumoral. Por último, las metástasis fundamentalmente óseas (M1) aunque pueden detectarse en hígado y otros órganos sólidos, se producen en la fase final de la enfermedad, asociándose a un crecimiento tumoral independiente de los andrógenos (Figura 9).

1.5.1.2- GRADO HISTOLÓGICO.

Debido a la gran heterogeneidad del cáncer de próstata que dificulta la valoración de su comportamiento biológico y limita la correlación histopatológica con la evolución de la enfermedad, surge la necesidad de establecer protocolos de gradación histológica.

Los sistemas más utilizados actualmente son: el patrón combinado de Gleason(*) y el sistema de la OMS (Bostwick y col., 1999).

Otras antiguas clasificaciones como la de Broders (1926), Gaeta (1981) y MD Anderson (1982) han sido sustituidas por la gradación histológica de Gleason .

1.5.1.2.a- Sistema de Gleason.

Es en la actualidad el sistema más utilizado. Fue desarrollado y evaluado por la “Veteran Administration Cooperative Urological Research Group” (VACURG), que estudió el cáncer prostático en un estudio clínico prospectivo aleatorio con más de 4.000 pacientes de 20 hospitales de la Veteran Administration (VA), en los EUA, desde 1960 a 1975.

Este sistema fue publicado por DF.Gleason en el año 1966, y redefinido en 1974 y 1977.

Los patrones histológicos observados se categorizan por la extensión de la diferenciación glandular, y el patrón de crecimiento del tumor en el estroma prostático (Figura 10). Así, se obtienen 5 grados. El grado 3 se divide a su vez en 3A,3B y 3C, y los grados 4 y 5 se dividen en 4A y 4B, 5A y 5B, respectivamente.

En los trabajos de Gleason y col. (Aihara, 1994), se evidenció que en más del 50% de los casos, el carcinoma prostático contenía dos o más patrones arquitectónicos. Además, se observó que el número de patrones aumentaba con el volumen tumoral.

Por otro lado, observaron que en el 53% de los casos que mostraban múltiples patrones se podía reconocer un carcinoma de alto grado entre zonas moderadamente y bien diferenciadas (Aihara, 1994).

En el sistema de Gleason esta gran heterogeneidad tumoral queda reflejada asignando un primer grado al patrón dominante (el más observado), y un segundo grado al segundo patrón más frecuente.

Ambos grados se suman para obtener valores comprendidos entre el 2 y el 10, dando lugar al denominado patrón combinado de Gleason .

Así quedan establecidos los adenocarcinomas:

- bien diferenciados: valores de 2 a 4
- moderadamente diferenciados: valores de 5 a 7
- mal diferenciados: valores de 8 a 10

La gradación microscópica del carcinoma prostático se ha correlacionado de forma significativa con la extensión local de la enfermedad, la incidencia de metástasis ganglionar y ósea, la respuesta terapéutica, y la supervivencia (Ross y col., 2002).

El sistema de gradación de Gleason se ha correlacionado asimismo con otros marcadores de agresividad biológica, como son el aumento de la proliferación celular, la presencia de poblaciones celulares aneuploides, la activación de oncogenes, y la mutación de genes supresores tumorales (Ross y col., 2002). Además, el grado de Gleason ha sido altamente predictivo de una rápida progresión de la enfermedad reflejado en el PSA post-operatorio (Koch y col., 2000).

A pesar de que el sistema de Gleason es uno de los predictores más potentes del comportamiento biológico y potencial metastásico del cáncer prostático, no ha sido capaz, utilizado de forma aislada, de predecir el pronóstico en la mayoría de estudios (Ross y col., 2002).

El poder pronóstico del patrón combinado de Gleason ha demostrado ser mayor en los tumores bien diferenciados (grado:2-4), y mal diferenciados (grado:8-10), que en los moderadamente diferenciados (grado:5-7), mostrando una agresividad biológica heterogénea poco predecible.

En las biopsias por aguja, existe una mayor correlación con la pieza de prostatectomía en los casos moderadamente y pobremente diferenciados (Bostwick, 1994). Las discrepancias son mayores en los adenocarcinomas con Gleason bajo (2-4), y en biopsias con escaso material (Mills, 1986).

Existe además una considerable variabilidad inter- y intra-observador que dificulta el uso del patrón de Gleason como indicador pronóstico en pacientes con cáncer de próstata.

La experiencia es fundamental para evitar la sobre o infragradación de los tumores, y para aumentar la concordancia entre el diagnóstico en la biopsia con aguja y la pieza de prostatectomía radical.

1.5.1.2.b- Sistema de Mostofi (OMS).

Fue descrito por Mostofi en el año 1975, y subdivide el carcinoma prostático en base a la diferenciación glandular y la anaplasia nuclear.

La diferenciación glandular se clasifica en cuatro grados, del grado 0, con un 100% de glándulas diferenciadas, al grado 4, que muestra un componente tumoral pobremente diferenciado que constituye más del 25% del total tumoral.

La anaplasia nuclear se valora desde el grado 1, con anaplasia nuclear leve, hasta el grado 3, con marcados cambios nucleares.

Sumando ambos grados se obtiene una escala aditiva que va desde el 1 al 7, que se correlacionan con el pronóstico. Este sistema de clasificación está actualmente en desuso.

1.5.1.3- ESTADO DE LOS MÁRGENES QUIRÚRGICOS.

Actualmente con la nueva clasificación pTNM se introduce un descriptor R1 para indicar margen (+) o enfermedad microscópica residual. La presencia de células tumorales en el margen de resección puede ocurrir como enfermedad extraprostática (pT3), intracapsular, o intraprostática (pT2), dependiendo del plano de disección quirúrgico.

Así, existen casos con márgenes positivos que son erróneamente incluidos en la categoría pT3. Además es importante la localización exacta del margen positivo, ya que la infiltración del ápex prostático tiene menor impacto negativo que en otras localizaciones.

La OMS recomienda que el informe anátomo-patológico incluya la presencia, localización, y extensión de la infiltración tumoral en todos los márgenes quirúrgicos. También recomienda informar sobre la presencia de glándulas prostáticas benignas en los márgenes de resección, ya que podrían aumentar la producción de PSA después de la cirugía.

El grupo de CAP recomienda la identificación y localización de los márgenes quirúrgicos positivos (Gleason y col., 1977) pero reconoce la enorme variabilidad en la definición de margen positivo, y las discrepancias en el método utilizado para examinar dichos márgenes.

La infiltración tumoral de los márgenes quirúrgicos afecta de forma significativa a la progresión de la enfermedad, y se correlaciona con tumores de alto grado y poblaciones celulares aneuploides (Epstein y col., 1993) (Cheng y col., 1999). Además, se ha evidenciado que los casos con márgenes positivos mostraban unos niveles de PSA superiores en el momento del diagnóstico (Humphrey y col., 1993) (Epstein y col., 1996).

Finalmente, se destaca que la longitud del margen afectado puede ser importante, y se recomienda incluirla en el informe ya que tiene un valor pronóstico contrastado. Aunque la localización y el método para medir la longitud afectada son todavía cuestiones que permanecen abiertas.

1.5.1.4- Antígeno prostático-específico (PSA).

El antígeno prostático específico (PSA) es considerado actualmente el marcador más importante para la detección precoz y el cribaje del cáncer de próstata.

Fue inicialmente descrito por Wang y col. en 1979. Es una glicoproteína secretada por las células lumbinales de los acinos y conductos prostáticos al líquido seminal. Su función fisiológica es licuar el gel seminal mediante su acción serín-proteasa.

Es producido tanto en el tejido prostático benigno, como en las células del cáncer de próstata. Sus niveles en suero pueden variar con las manipulaciones de la glándula prostática (sondaje, tacto rectal,...), también dependiendo del volumen y grado tumoral, y de otros factores (Morote y col., 2000).

El PSA presenta una sensibilidad elevada para la detección del cáncer prostático. Sin embargo, es poco específico, ya que se ha detectado PSA de origen no prostático, incluso en el suero de mujeres, aunque en niveles muy bajos (Filella y col., 1996). Se ha hallado que el PSA muestra una mayor sensibilidad para la detección del cáncer prostático, cuando se establece el valor de corte de 4,0 ng/ml, que es valor recomendado internacionalmente.

Por otro lado, el PSA puede estar elevado en un 20% de las hiperplasias benignas de próstata, y en cambio en algunos cánceres localizados sus niveles pueden encontrarse dentro de la normalidad (Lee, 1989).

Diversos estudios han reportado la utilidad clínica de los niveles de PSA valorado conjuntamente con otros parámetros, como el grado tumoral, el tacto rectal, y el estudio ecográfico, para establecer la posibilidad de diseminación extraprostática y de metástasis ganglionar (Morote y col., 2000, 2002). También es muy útil para la monitorización de los pacientes y después de su diagnóstico inicial y tratamiento (Drago y col., 1989).

Actualmente, se considera que la lesión de PIN no produce un aumento significativo del PSA. Cuando un paciente diagnosticado de PIN muestra unos niveles elevados de PSA, se recomienda la repetición de la biopsia, debido a la posibilidad de un carcinoma prostático acompañante no detectado inicialmente.

El PIN es una lesión intraepitelial, y el PSA sintetizado por las células lumbinales es secretado al líquido seminal más que al estroma y a los vasos sanguíneos (Montironi y col., 2000).

Para aumentar la sensibilidad y especificidad del PSA sérico, se han calculado diversos índices, como la densidad del PSA, la velocidad del PSA, y especialmente el porcentaje de PSA libre. La determinación del PSA libre respecto al valor del PSA total ayuda a discriminar entre el cáncer de próstata y las enfermedades prostáticas benignas (Morote y col., 1999).

El CAP manifiesta que las medidas derivadas del PSA (como el porcentaje de PSA libre) todavía se consideran factores pronósticos de categoría III, ya que actualmente existe una importante variación en la información reportada.

1.5.2- CATEGORÍA II

1.5.2.1- Contenido de ADN ploidía .

La mayoría de estudios retrospectivos apoyan la aneuploidía del ADN en piezas de prostactomía radical como factor predictivo independiente de un mal pronóstico en el cáncer de próstata (Winkler, 1988). Pero su papel clínico está aún en discusión (Montgomery y col., 1990).

Numerosos estudios sugieren que el análisis de ploidía ofrece información pronóstica adicional, pero no se recomienda su uso de forma rutinaria, ya que no existe un consenso respecto el método estándar a utilizar (Peters y col., 1990 y 1992). Algunos tumores por su pequeño tamaño excluyen la utilización del único método actualmente estandarizado, la citometría de flujo.

La utilización de técnicas de imagen en muestras de core-biopsia prostática para el análisis de la ploidía del ADN, ha demostrado la presencia de ADN aneuploide que se correlaciona con el estado de ploidía en las correspondientes piezas de prostatectomía y se comporta como un factor predictivo independiente del pronóstico de la enfermedad (Ross y col., 1994).

Todavía existe la necesidad de más estudios que permitan llegar a un consenso y a la estandarización de los métodos de análisis de imagen para recomendar su uso clínico.

1.5.2.2- Volumen Tumoral en biopsias por aguja.

Se recomienda incluir en el informe anátomo-patológico de cáncer prostático los siguientes aspectos: nº de cilindros afectados, porcentaje de cilindro afectado, longitud total (mm) de tumor en todos los cilindros y longitud máxima única (mm) de tumor en cualquier cilindro y porcentaje total de biopsias afectadas (área de la superficie afectada). Existe enorme variabilidad sobre como cuantificar los cilindros , como valorar los casos fragmentados, y sobre como contar dos focos independientes de tumor en la misma biopsia cuando existe tejido no tumoral entre ambos focos tumorales.

1.5.2.3- Volumen Tumoral en la pieza de prostatectomía.

No existe un método aceptado de cuantificación de volumen tumoral, debido a que el tallado parcial frente al total de la pieza de prostatectomía sigue siendo una cuestión no resuelta. No obstante, se recomienda incluir en el informe anátomo-patológico la extensión intraprostática del tumor, que debe ser evaluada por algún método estándar que permita reportar el porcentaje de tumor en la muestra analizada. En aquellos casos de inclusión total en bloque grande (de secciones de 3 mm. de grosor) se ha sugerido la fórmula :

$\Sigma(a \times b \times c \times fc)$ siendo a, b y c diámetros máximos del tumor en cada sección y fc el factor de corrección de la elipse que es 1.4.

1.5.2.4- Tipo histológico de carcinoma.

El CAP recomienda incluir en el informe el subtipo histológico (células pequeñas, ductal, mucinoso,...), ya que tiene implicaciones pronósticas y terapéuticas significativas. Si bien el adenocarcinoma de tipo acinar originado en la zona periférica prostática constituye más del 90% de los casos diagnosticados de cáncer prostático, existe un 10% de casos que corresponden a otros subtipos histológicos:

***El adenocarcinoma ductal** es un tumor infrecuente (<1%) que se origina a partir de los ductos periuretrales prostáticos puede tener un patrón túbulo-papilar o cribiforme (Randolph y col., 1997) (Kuhadja y col., 1984). La mayoría de casos muestran asociado un componente acinar típico (80%), y pueden observarse en la próstata periférica. Presenta inmunoreactividad para el PSA y la fosfatasa ácida prostática (PSAP) y suele diagnosticarse ya en estadios avanzados sin correlacionarse con niveles elevados de PSA.

El grado asignado de Gleason depende de la arquitectura, oscilando entre un grado 3 (tumor cribiforme regular, bien circunscrito), grado 4 (masas irregulares cribiformes y papilares) y el grado 5 (comedonecrosis). En general tiene un curso más agresivo que el adenocarcinoma convencional (Bock y Bostwick, 1999).

***El carcinoma mucinoso o coloide** produce abundante mucina extracelular. Suele adoptar un patrón predominante cribiforme con áreas glomeruloides y muestra asimismo inmunoreactividad para PSAP y PSA. Se considera un tumor de grado de Gleason 4, y suele presentar respuesta a la hormonoterapia aunque frecuentemente evoluciona a enfermedad metastásica (Epstein y col., 1985).

***El carcinoma de células en anillo de sello** es una forma rara de carcinoma prostático de alto grado indiferenciado (grado 5 de Gleason), con inmunoreactividad para la fosfatasa ácida prostática (PSAP) y el PSA. Suele presentarse junto al adenocarcinoma acinar típico y tiene muy mal pronóstico (Alline, 1992) (Ro y col., 1988). La mayoría de estos tumores suelen presentarse en estadios avanzados, con una supervivencia de 30 a 60 meses tras el diagnóstico.

***El carcinoma basaloide y adenoide quístico** de próstata es muy poco frecuente. Se cree originado a partir de las células basales o con menor probabilidad de las glándulas seromucinosas periuretrales. La inmunotinción para el PSA y el PSAP es negativa, y su comportamiento está poco definido, aunque se han descrito raramente metástasis a distancia (Kuhajda y col., 1984).

***El carcinoma adenoescamoso y el carcinoma escamoso** puro se han relacionado con el tratamiento hormonal y la radioterapia. El carcinoma escamoso puro es muy poco frecuente, y se ha descrito su aparición en adenocarcinomas convencionales tratados con estrógenos, aunque puede desarrollarse de novo a partir de células indiferenciadas pluripotenciales (Saito y col., 1984) (Moyana, 1987).

***El carcinoma de indiferenciado célula pequeña** suele estar asociado al adenocarcinoma acinar convencional (50%). Las células neuroendocrinas se identifican frecuentemente en el adenocarcinoma convencional, pero este término debe restringirse a aquellos casos puros o mixtos con criterios morfológicos idénticos al carcinoma de célula pequeña del pulmón o de otras

localizaciones . Presenta inmunoreactividad para marcadores neuroendocrinos. El pronóstico es muy malo, con una media de supervivencia de 7,7 meses (Ro y col., 1987).

***El carcinoma de células transicionales** puede ser primario prostático o de la uretra prostática (0,7-2,8% de los tumores prostáticos del adulto), pero generalmente es secundario y extrínseco por invasión de la próstata a partir de un carcinoma primario transicional de vejiga urinaria (45% de los carcinomas de vejiga). El carcinoma transicional primario prostático es un tumor con inmuntinción positiva para citoqueratina 7 y 20, y negativa para el PSAP y el PSA. Tiene un pronóstico desfavorable siendo refractario al tratamiento hormonal (Johnson y col., 1972).

***El carcinoma de tipo linfoepitelioma** (carcinoma indiferenciado con estroma linfoide) es extraordinariamente raro. Muestra nidos de células indiferenciadas de patrón sincitial en un estroma linfoide denso. Tan sólo se han reportado dos casos con un significado pronóstico incierto (Adlakha y Bostwick, 1994).

***Los carcinomas sarcomatoides y carcinosarcomas** son tumores bifásicos rápidamente progresivos, constituidos por un componente de adenocarcinoma y otro componente sarcomatoso. Algunos autores usan el término de carcinosarcoma en tumores con componentes heterólogos, y de carcinoma sarcomatoide en su ausencia. La inmuistoquímica muestra positividad focal para PSA, PAP y queratinas en el componente epitelial, mientras que el componente sarcomatoso puede mostrar positividad para la vimentina, S-100, actina y desmina. Su pronóstico es desfavorable, con supervivencias que varían entre 9,5 y 48 meses según las series (Lauwers y col., 1993) (Shannon y col., 1992).

1.5.3- CATEGORÍA III

1.5.3.1- Invasión perineural.

En las piezas de prostatectomía radical la presencia de invasión perineural carece de significado pronóstico. En la mayoría de casos de adenocarcinoma de la zona periférica se pueden identificar focos de invasión perineural (75-84% de los casos). Ha sido demostrado que la invasión perineural no representa una invasión vascular o linfática tumoral, sino que refleja la infiltración neoplásica a través de planos de menor resistencia tisular cercanos a los filetes nerviosos. Se ha evidenciado que este es uno de los principales mecanismos que utiliza el carcinoma prostático para su extensión extraprostática.

En diversos estudios la invasión perineural ha demostrado ser un factor predictivo de progresión tumoral en análisis univariados, mientras que carece de significado en análisis multivariados (Ravery y col., 1994). Recientemente se ha sugerido que la presencia de invasión perineural en biopsias por aguja puede tener un valor predictivo independiente de la evolución de la enfermedad después de la prostatectomía radical en casos de cáncer localizado (D'Amico y col., 2001).

1.5.3.2- Micrometástasis ganglionar.

El CAP destaca las diferencias existentes en el método utilizado para su evaluación, incluyendo estudios inmunohistoquímicos y métodos moleculares. Actualmente, no existe un acuerdo en la definición de micrometástasis en el cáncer prostático, y la significación clínica de pequeños focos de carcinoma en los ganglios linfáticos es incierta. Es aceptado como micrometástasis una metástasis ganglionar confirmada histológicamente igual o inferior a 2mm.

1.5.3.3- Diferenciación neuroendocrina.

La diferenciación neuroendocrina en la próstata fue descrita inicialmente por Azzopardi y Evans en 1971, evidenciando que el 10% de los carcinomas prostáticos contenían células argentafines. Posteriormente, diversos investigadores han confirmado estos hallazgos hasta en el 47% de cánceres de próstata (Abrahamsson y col., 1987). Los trabajos mas importantes son los de di Sant'Agnese PA, que evidenció las implicaciones pronósticas y terapéuticas de la diferenciación neuroendocrina en el cáncer prostático (di Sant'Agnese, 1992 y 1996).

El carcinoma prostático puede mostrar diferentes formas con diferenciación neuroendocrina, como el carcinoma neuroendocrino de células pequeñas y el carcinoide. Si exceptuamos estas variantes morfológicas, en el adenocarcinoma prostático convencional también se pueden observar áreas de diferenciación neuroendocrina focal.

Diversos estudios han intentado relacionar la diferenciación neuroendocrina con el pronóstico, generando resultados contradictorios. Algunos estudios han demostrado una correlación con el grado y el estadio tumoral, pero en otros no se ha demostrado ninguna correlación (di Sant'Agnese, 2000).

Los adenocarcinomas prostáticos con extensa diferenciación neuroendocrina pueden ser resistentes a la terapia hormonal debido a la falta de receptores androgénicos de las células neuroendocrinas.

1.5.3.4- Morfometría nuclear.

Diversos estudios han intentado correlacionar mediante técnicas de análisis de imagen el tamaño, forma, textura nuclear, y el número, forma y tamaño de los nucleolos con el pronóstico en el cáncer de próstata. Su uso como factor pronóstico se ha visto dificultado por la variabilidad y dificultad de las técnicas de imagen utilizadas, así como la escasa reproducibilidad de los resultados obtenidos (Blom y col., 1990).

1.5.3.5- Marcadores de proliferación celular.

Se han desarrollado una gran variedad de técnicas para medir la proliferación celular en los tejidos. En el cáncer de próstata, los métodos principales son la utilización de marcadores inmunohistoquímicos, y el estudio de la fase S por citometría de flujo o mediante técnicas de análisis de imagen con histogramas de cuantificación del ADN.

El análisis inmunohistoquímico con el marcador de proliferación celular MIB-1/ Ki67, es actualmente la técnica de elección en tejidos parafinados. Se ha demostrado que índices de proliferación celular superiores al 16-20% detectados con el MIB-1/ Ki67 se asocian a niveles altos de proliferación celular tumoral con mal pronóstico (Goel y col., 1996) (Scalzo y col., 1998).

Además, la sobreexpresión de MIB-1 se ha asociado a resistencias en el tratamiento (Scalzo y col., 1998) y es un factor predictivo del pronóstico incluso en pacientes con metástasis ganglionar (Cheng y col., 1999).

El estudio de la fase S por citometría de flujo y las técnicas de análisis de imagen, han sido de menor utilidad clínica para el cáncer de próstata.

1.5.3.6- Oncogenes y genes supresores tumorales en el Cáncer de Próstata.

El proceso de carcinogénesis implica múltiples cambios genéticos con activación de oncogenes que promueven el crecimiento celular, y la pérdida o inactivación de genes supresores tumorales que regulan de forma negativa dicha proliferación.

El adenocarcinoma prostático muestra una gran heterogeneidad morfológica que se refleja a nivel genético. El desarrollo de técnicas de microdissección tisular permitirá el estudio de las lesiones de PIN, de carcinoma y tejido benigno, estableciendo el patrón evolutivo de carcinogénesis que se inicia en el PIN y progresa hasta el carcinoma invasor (Emmert-Buck y col., 1995) (Qian y col., 1995).

Los oncogenes tienen un papel fundamental en el desarrollo de neoplasias epiteliales del tracto gastrointestinal y del aparato respiratorio. En el adenocarcinoma prostático los oncogenes parecen tener un papel limitado en el establecimiento y desarrollo de la neoplasia (Isaaks y col., 1997) (Wang y col., 1997) . Los genes *ras*, frecuentemente mutados en neoplasias epiteliales del tracto gastrointestinal, hepatobiliar, y respiratorio, muestran escasas alteraciones en el cáncer de próstata, reflejados en diversas líneas celulares y modelos experimentales de cáncer prostático (Neto y col., 1994).

La amplificación del gen *myc* ha sido estudiado en el cáncer de próstata, pero no se ha asociado a una progresión de la enfermedad. Por otro lado, mutaciones del gen *myc* se han asociado al desarrollo de un fenotipo refractario a los andrógenos (Ross y col., 1993).

La amplificación del gen HER2/neu (c-erbB-2) o la sobreexpresión de su proteína, se han asociado en el cáncer de próstata a un mal pronóstico (Ross y col., 1993) (Morote y col., 1999). Sus niveles de ARN mensajero se han correlacionado con el desarrollo de metástasis y con una falta de respuesta al tratamiento hormonal (Signoretti y col., 2000).

El enzima detoxificante glutatión S-transferasa II , también ha demostrado estar implicado en el cáncer prostático. Se ha observado una disminución de su expresión en la mayoría de carcinomas prostáticos por mecanismos de metilación del promotor (Lee W-H y col., 1994).

Por último, estudios recientes han apuntado al papel del enzima alfa-metil-CoA-racemasa como marcador del cáncer prostático (Luo J y col., 2002). Este enzima participa en la β -oxidación de los ácidos grasos y en el metabolismo de los ácidos biliares, y su expresión aumenta en el carcinoma con respecto al tejido benigno. Estudios recientes han sugerido su utilización en tejidos como marcador del cáncer prostático (Rubin y col., 2002) (Jiang y col., 2001).

En cuanto las alteraciones en genes supresores tumorales, diversos estudios han demostrado la acumulación de la proteína p53 entre el 13% y el 23% según las series de carcinomas prostáticos (Ross y col., 1997).

Se han detectado mutaciones de p53 en casos de carcinomas prostáticos metastásicos (Visakorpi y col., 1991), y un 42% de los casos contienen mutaciones de p53 mediante técnicas de biología molecular (Chi y col., 1994). Por otro lado, se ha demostrado una asociación positiva entre la inmunoreactividad nuclear para p53 y un comportamiento agresivo de la neoplasia (Kallakury y col., 1994) (Navone y col., 1993) (Stackhouse y col., 1999) (Leibovich y col., 2000) (Borre y col., 2000) (Quinn y col., 2000).

Se han detectado deleciones y mutaciones del gen PTEN (MMAC-1) en líneas celulares de cáncer de próstata (Amanatullah y col., 2000) y en tejido parafinado. La pérdida de expresión de PTEN se ha asociado a un mayor grado de Gleason y estadio tumoral (McMenamin y col., 1999).

Por último, el gen del retinoblastoma (pRB) podría estar alterado en un pequeño subgrupo de cánceres prostáticos (Ross y col., 1997).

1.5.3.7- Marcadores de apoptosis en el Cáncer de Próstata.

La apoptosis depende de un balance entre proteínas agonistas y antagonistas que interaccionan entresí formando homo y heterodímeros, cuya proporción determinará finalmente una estimulación o inhibición de la apoptosis. Se ha demostrado que la deprivación androgénica en modelos animales induce en la glándula prostática una muerte epitelial masiva por apoptosis (Isaacs y col., 1992). Dado que la población tumoral es heterogénea, se produce a posteriori una selección de clones celulares andrógeno independientes que siguen proliferando sin sufrir apoptosis.

La proteína oncogénica Bcl-2 inhibe la apoptosis y ocupa un papel central su regulación (Lu y col., 1996). Se ha demostrado que la neoplasia intraepitelial prostática además de mostrar un aumento de proliferación en el epitelio secretor, se observa también un aumento en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 hasta en un 20% de las lesiones de PIN (Bonkhoff y col., 1998).

Además este aumento se acompaña se una pérdida de receptores androgénicos (Van der Kwast y col., 1999) y la adquisición de receptores para estrógenos (Bonkhoff y col., 1999).

Por otro lado, Bcl-2 ha demostrado ser un marcador pronóstico independiente en el carcinoma prostático, y niveles elevados de Bcl-2 se han correlacionado con tumores refractarios al tratamiento hormonal (Moul y col., 1996), aumentando su expresión en células tumorales andrógeno independientes (Krajewski y col., 1994).

Entre las proteínas inductoras de la apoptosis destaca el Bax. Esta proteína se ha detectado en las células basales de la glándula prostática, y sus niveles aumentan en el epitelio secretor prostático (Shabaik y col., 1994). McConkey y col. observaron que la línea celular metastásica de cáncer de próstata LNCaP mostraba unos niveles bajos de expresión de Bax. Estas células demostraron ser más resistentes a la apoptosis y continuaban proliferando y formando tumores después del tratamiento con deprivación hormonal (Raffo y col., 1995).

La proteína p53 es imprescindible en la apoptosis, y participa en la regulación de la expresión de Bcl-2 y Bax (Miyashita y col., 1994). En la próstata, la apoptosis que se observa tras la ablación androgénica no estaría mediada por p53, ya que se ha demostrado muerte celular por apoptosis en líneas celulares PC-3 nulas para la expresión de p53 (Berges y col., 1993). En cambio la transfección de p53 en ratones portadores de la línea celular Tsu-pr1 defectuosa para p53 es capaz de inducir la apoptosis y suprimir así el crecimiento tumoral (Screaton y col., 1992).

Estos hallazgos sugieren que diversos mecanismos moleculares se activan o suprimen en la regulación de la muerte celular programada en el cáncer de próstata.

2. PRINCIPIOS BIOLÓGICOS DE LA ANGIOGÉNESIS.

2.1- FACTORES ANGIOGÉNICOS.

Se han descrito diversos factores que actúan como señales que contribuyen a iniciar el proceso de angiogénesis (Carmeliet, 2000), estos incluyen :

- Situaciones de estrés metabólico celular (por ej. una baja presión de oxígeno, y la hipoglicemia).
- Estrés de tipo mecánico en los tejidos (debido fundamentalmente a la presión generada por las células en proliferación).
- En respuesta a diversas sustancias producidas por células inflamatorias que infiltran los tejidos.
- Debido a mutaciones genéticas (la activación de oncogenes, o la pérdida de genes supresores tumorales que controlan o producen sustancias reguladoras de la angiogénesis).

En todos estos procesos de desarrollo, fisiológicos y patológicos, es necesario un control estricto del balance entre estimulación e inhibición de la angiogénesis. En las neoplasias este balance se inclina a favor de la formación de nuevos vasos (Hanahan y col., 1996).

Existen un número creciente de sustancias pro- y anti-angiogénicas.

Tabla 4. Factores angiogénicos y anti-angiogénicos en la progresión neoplásica.

Promotores endógenos de la angiogénesis

Factor de crecimiento vascular endotelial A, B, C, D
(VEGF-A,-B,-C,-D)

Angiopoyetinas

Angiogenina

Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)

Efrinas

Factor de crecimiento hepatocitario (HGF)

Interleukina-8

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

Factor transformante β (TGF- β)

Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)

Inhibidores endógenos de la angiogénesis

Angiostatina

Endostatina

Factor inhibidor de la angiogénesis derivado del glioma (GD-AIF)

Interferones

Fragmento de prolactina (16Kd)

Trombospondina -1

Inhibidor del factor de crecimiento vascular (VEGI)

2.1.1- FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)

El proceso de angiogénesis está controlado por señales químicas denominadas factores angiogénicos. De ellos el más potente es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), también llamado factor de permeabilidad vascular (VPF). Fue descrito en 1983 por Senger y col. como una proteína capaz de aumentar la permeabilidad vascular en la piel de cerdos de guinea.

Posteriormente, en 1989 Ferrara y Henzel, y paralelamente Ploüet y col. describieron de forma independiente la purificación y secuenciación de un factor mitógeno específico de la célula endotelial, al que llamaron respectivamente, factor de crecimiento endotelial (VEGF) y vasculotropina. Estudios moleculares posteriores revelaron que se trataba de la misma proteína.

La especificidad de VEGF para el endotelio vascular hizo plantearse su papel clave en la regulación del crecimiento fisiológico y patológico vascular (Leung y col., 1989). El trabajo desarrollado en la última década por laboratorios de todo el mundo ha hecho posible dilucidar el papel del VEGF en la angiogénesis (Ferrara y col., 1993).

2.1.1.a- FUNCIONES BIOLÓGICAS DE VEGF.

El factor de permeabilidad vascular o factor de crecimiento endotelial (VPF/ VEGF) es una citoquina muy potente que juega un papel fundamental en el proceso de la angiogénesis, tanto a nivel de la angiogénesis fisiológica, como a nivel de la angiogénesis tumoral. Sus principales acciones son:

- Actúa fundamentalmente a nivel de las células endoteliales (Senger y col., 1993) induciendo cambios en la expresión genética de la célula (Pepper y col., 1992) (Unemori y col., 1992), en su forma (Senger, 1993), estimulando su división y migración, y aumentando los niveles de calcio intracelulares (Connolly y col., 1989) (Favard y col., 1991) (Brock y col., 1991).
- El VEGF es un potente agente mitógeno que actúa sobre las células endoteliales de la micro y macrovasculatura de arterias, venas y vasos linfáticos, careciendo de actividad mitógena en otros tipos celulares (Ferrara y Henzel, 1989). Por lo tanto **VEGF es considerado un factor mitógeno específico de la célula endotelial.**
- Además de la acción a nivel de las células endoteliales, el VEGF incrementa de forma potente la permeabilidad vascular (Dvorak, 1995). Es una vía indirecta de estimulación de la angiogénesis que precede, o se produce de forma simultánea a su acción sobre las células endoteliales, y que ha demostrado ser un paso clave en el proceso de angiogénesis.
- VEGF promueve la angiogénesis de forma sinérgica con bFGF en modelos *in vitro* (Pepper y col., 1993). También es capaz de inducir de forma potente la angiogénesis en modelos *in vivo* (Philips y col., 1995).
- VEGF induce la expresión de activadores del plasminógeno de tipo Uroquinasa y factor Tisular, y también de factores inhibidores del plasminógeno en cultivos de células endoteliales (Pepper y col., 1991). Otros estudios han demostrado que VEGF aumenta la expresión de

receptores de uroquinasa en las células endoteliales (Mandriota y col., 1995).

- Se han observado funciones de regulación de VEGF sobre las células sanguíneas (Clauss y col., 1990). VEGF es capaz de promover el quimiotactismo de los monocitos, y de inducir la formación de colonias de granulocitos y macrófagos maduros.
- Por otro lado, VEGF ejerce una acción inhibitoria sobre las células presentadoras de antígeno, facilitando que los tumores puedan vencer el sistema de vigilancia inmunitario del organismo (Gabrilovich y col., 1996).
- En estudios *in vitro* VEGF induce vasodilatación de forma dosis-dependiente, taquicardia e hipotensión. Estos efectos parecen ser debidos a una disminución del retorno venoso causado por el óxido nítrico (NO) producido por las células endoteliales (Ku y col., 1993) (Yang y col., 1996).

2.1.1.b- ESTRUCTURA DE VEGF.

El gen humano se encuentra localizado en el cromosoma 6p21.3 (Vincenti y col., 1996), y consta de ocho exones separados por siete intrones. La región codificante ocupa 14 Kb (Houck y col., 1991) (Tischer y col., 1991).

La familia de VEGF consta actualmente de cuatro miembros: VEGF-A, que es el principal miembro implicado en la angiogénesis, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D, que se encuentra implicado principalmente en la linfangiogénesis.

De VEGF-A existen cuatro isoformas que se generan por mecanismos de splicing alternativo y constan de: 121, 165, 189 y 206 aminoácidos respectivamente (VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189 y VEGF 206). A VEGF 165 le faltan los residuos codificados por el exón 6, mientras que a VEGF 121 los codificados por el exón 6 y 7. Comparado con VEGF 165, a VEGF 121 le faltan 44 aminoácidos (Figura 11).

VEGF 189 muestra la inserción de 24 aminoácidos, muy ricos en residuos básicos; y VEGF 206 tiene la inserción adicional de 17 aminoácidos.

VEGF 165 es la forma molecular predominante, y es producida por varios tipos de células normales y neoplásicas. VEGF 121 y VEGF 189 son detectados en la mayoría de tejidos que expresan VEGF, mientras que VEGF 206, es una forma muy poco frecuente, que solamente se ha detectado en el hígado fetal humano (Houck y col., 1991).

VEGF 165 es una glicoproteína básica homodimérica que pesa 45 KDa, con capacidad de unión a la heparina. Por otro lado, VEGF 121 es levemente ácida y no se une a la heparina. VEGF 189 y VEGF 206, son más básicas y se unen a la heparina con mayor afinidad que VEGF 165. Las diferencias en el punto isoeléctrico y de afinidad a la heparina, son determinantes para la biodistribución de VEGF en los tejidos (Houck y col., 1992).

Así, VEGF 121 se encuentra en el medio en forma libre y soluble; VEGF 165 también es secretada, pero una fracción importante permanece unida a la membrana celular y a la matriz extracelular.

En contraste, VEGF 189 y VEGF 206, están secuestradas en la matriz extracelular. Estas isoformas son liberadas y solubles por la acción de sustancias como la plasmina, o la heparina (Park y col., 1993).

Se ha demostrado que la activación del plasminógeno y la formación de plasmina, son muy importantes en las cascada de la angiogénesis. Estos hallazgos sugieren que VEGF está disponible al menos, por dos mecanismos diferentes: de forma libre y soluble (VEGF 121 y VEGF 165) o mediante su activación por proteasas a partir de formas de mayor tamaño molecular. Por tanto VEGF, muestra una gran heterogeneidad estructural y funcional, que le permita generar una respuesta biológica controlada y adecuada a cada proceso angiogénico.

2.1.1.c- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VEGF.

- La hipoxia:

La tensión de oxígeno es el principal mecanismo de regulación de VEGF, tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha demostrado que la exposición de células normales y neoplásicas en cultivo a bajas tensiones de oxígeno aumenta de forma rápida y reversible la expresión de VEGF (Minchenko y col., 1994) (Shima y col., 1995). La isquemia inducida en ratones por oclusión de la arteria coronaria descendente anterior, produce un dramático incremento en los niveles de RNAm, apoyando un papel de VEGF en el proceso de neovascularización que sigue al infarto de miocardio (Banai y col., 1994) (Hashimoto y col., 1994). Además, la regulación hipóxica de VEGF en células neurogliales ha sido implicada en el desarrollo de los vasos retinianos (Stone y col., 1995).

La regulación de VEGF por la hipoxia se produce por una activación de la transcripción, y por mecanismos post-transcripcionales, mediante una estabilización del RNAm (Ikeda y col., 1995).

Además, existen importantes similitudes entre los mecanismos de regulación por hipoxia de VEGF y la Eritropoyetina (Epo). Observándose homologías entre una secuencia de 28 pares de bases en el promotor 5' de VEGF y el factor hipóxico-inducible (HIF-1) del gen de la Epo (Madan y col., 1993).

- Citoquinas y Factores de crecimiento:

Diversas citoquinas y factores de crecimiento participan en la regulación de VEGF aumentando su expresión:

- El factor de crecimiento epidérmico (EGF)
- El factor de crecimiento de queratinocitos (KGF)
- El factor de crecimiento fibroblástico (FGF)
- El factor transformante de crecimiento β (TGF β)
- La interleuquina 1 β (IL-1 β)
- La interleuquina 1 α (IL-1 α)
- La prostaglandina E2 (PGE2)

- La interleuquina 6 (IL-6)
- El factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1)
- El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

EGF, TGF- β y el KGF producen un marcado incremento en la expresión de VEGF (Frank y col., 1995). Se ha demostrado que EGF estimula la secreción de VEGF en cultivos celulares de glioblastoma (Goldman y col., 1993).

FGF y PDGF, también producen un incremento en la expresión de VEGF (Tsai y col., 1995) (Potapova y col., 1996) . Por tanto, VEGF actuaría como mediador paracrino de otros factores angiogénicos, como TGF - β , induciendo la expresión de VEGF en cultivos de células epiteliales y de fibroblastos (Pertovaara y col., 1994).

La IL-1 β induce la expresión de VEGF en células de músculo liso de la aorta (Li y col., 1995), y la IL-1 α y PGE₂, aumentan su expresión en cultivos celulares de células sinoviales, sugiriendo un papel de estos factores en la angiogénesis de procesos inflamatorios (Ben y col., 1995).

También la IL-6 ha demostrado aumentar la expresión de VEGF en diversas líneas celulares (Cohen y col., 1996), y el IGF-1 en líneas de carcinoma colorectal (Warren y col., 1996).

- Diferenciación celular y alteraciones genéticas:

La diferenciación celular interviene de forma importante en la regulación de la expresión de VEGF. Se ha observado un aumento en la expresión de VEGF durante la diferenciación de los preadipocitos 3T3 a adipocitos maduros. Opuestamente, la diferenciación de células de feocromocitoma PC12 en células neuronales no malignas, reprime la expresión de VEGF (Claffey y col., 1992).

Diversas alteraciones genéticas conducen a un aumento en la expresión de VEGF. La pérdida de la forma mutada de la proteína p53 murina, produce un aumento de VEGF en células NIH 3T3 (Kiesser y col., 1994). Por otro lado, mutaciones oncogénicas o amplificaciones de *ras* también provocan un aumento de VEGF (Rak y col., 1995) (Grugel y col., 1995).

El gen supresor de la enfermedad de von Hippel -Lindau (VHL) también ha sido implicado en la regulación de VEGF. La pérdida del gen VHL provoca una pérdida de inhibición de VEGF, aumentando consecuentemente su expresión (Iliopoulos y col., 1996).

2.1.1.d- EXPRESIÓN DE VEGF EN LA EMBRIOGÉNESIS.

La primera expresión de VEGF la encontramos en los primeros días del desarrollo embrionario en las células gigantes del trofoblasto (Breier y col., 1992) (Jakeman y col., 1993).

Posteriormente VEGF se expresa en diversos órganos, como el corazón, riñón, columna vertebral, y sistema nervioso central, fundamentalmente a nivel de los plexos coroideos y del epitelio ventricular (Breier y col., 1992).

A las 16-22 semanas del desarrollo fetal, se observa expresión de VEGF en el pulmón, riñón, y bazo (Shifren y col., 1994). La inactivación de uno de los alelos de VEGF es letal en embriones de ratón, muriendo entre los días 11 y 12 del desarrollo con anomalías severas del aparato circulatorio y del sistema nervioso central.

En el adulto se observa expresión de VEGF en procesos de angiogénesis fisiológica, como en el desarrollo del cuerpo lúteo y la curación de las heridas. También se expresa en tejidos con capilares en estado quiescente, como el riñón, corazón, pulmones y sistema nervioso. Por tanto, VEGF es necesario para el mantenimiento y supervivencia de los vasos no proliferantes (Ferrara, 1992) (Monacci y col., 1993).

2.1.1.e- EXPRESIÓN DE VEGF EN LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL.

Diversas líneas celulares tumorales han demostrado la síntesis de VEGF *in vivo* (Houck y col., 1992). Estudios de hibridación *in situ* han demostrado un aumento en la expresión de VEGF en la mayoría de los tumores humanos estudiados; incluyendo el cáncer de pulmón (Volm y col., 1997), mama (Brown y col., 1995) (Yoshiji y col., 1996), tracto gastrointestinal (Brown y col., 1993)

hígado (Suzuki y col., 1996), riñón y vejiga urinaria (Brown y col., 1993), ovario (Olson y col., 1994), endometrio y cérvix uterino (Guidi y col., 1995 y 1996), angiosarcomas (Hashimoto y col., 1995), tumores de células germinales (Viglieto y col., 1996) y en el glioblastoma multiforme (Phillips y col., 1993).

En algunos pacientes oncológicos se ha podido detectar concentraciones elevadas de VEGF en el suero (Kondo y col., 1994). Además, en algunos tipos tumorales, se ha correlacionado la expresión de VEGF con la densidad de vasos tumorales, demostrando ser un factor pronóstico independiente (Toi y col., 1996) (Gasparini y col., 1997) (Maeda y col., 1996).

Finalmente, la utilización de anticuerpos monoclonales anti-VEGF ha demostrado disminuir el crecimiento tumoral en modelos *in vivo* y *in vitro*, planteándose su aplicación como posible tratamiento en diversos tipos de tumores (Kim y col., 1992) (Borgstrom y col., 1996) (Yuan y col., 1996).

2.1.2- EL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO BÁSICO (bFGF).

El factor de crecimiento fibroblástico básico pertenece a la familia de los factores de crecimiento fibroblásticos. El bFGF (FGF2) fue purificado por Gospodarowicz en 1975. Fue la primera molécula que se purificó, y mostraba un punto isoeléctrico básico (Gospodarowicz, 1978). Posteriormente se aisló otra molécula de punto isoeléctrico ácido, el factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF) (Maciag y col., 1979) (Thomas y col., 1980).

Estos factores fueron inicialmente caracterizados como potentes factores mitógenos en células procedentes de extractos de la glándula pituitaria, comprobándose posteriormente que estimulaban la mitosis en otros tipos celulares, como los fibroblastos y las células endoteliales (Gospodarowicz, 1978). El hecho que FGF sea capaz de estimular la mitosis en las células endoteliales al igual que los factores angiogénicos ya conocidos, llevó a especular sobre una función o posible relación con la angiogénesis.

2.1.2.a- ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE bFGF.

Actualmente, la familia de los factores de crecimiento fibroblásticos consta de doce miembros (Delli Bovi y col., 1987) (Zhan y col., 1988) (Marics y col., 1989) (Yamasaki y col., 1996) (Smallwood y col., 1985); algunos de ellos con propiedades aún poco definidas. El bFGF y el aFGF son los factores más estudiados, destacando por sus acciones angiogénicas.

El genoma humano tan sólo tiene una copia del gen FGF2 que se encuentra situado en el cromosoma 4q 26-27 (Mergia y col., 1986). El gen tiene un tamaño de 40 kb, y está constituido por 3 exones y 2 intrones (Figura 12).

Se han descrito diversas isoformas del FGF2, con pesos moleculares que oscilan entre 18 y 25 kd. La forma de 18 kd es citosólica, mientras que las formas de mayor peso molecular (entre 22 a 25 kd) se localizan en el núcleo, donde estimulan el crecimiento celular (Prats y col., 1989).

El bFGF actúa como un factor mitógeno en un amplio espectro de células de mamíferos, y en diversas estirpes celulares, incluyendo el endodermo, el mesodermo, y el neuroectodermo. También se ha observado que actúa sobre células epiteliales prostáticas, endoteliales, de músculo liso, y osteoblastos (Chapronicre y col., 1986) (Maciag y col., 1981) (Chen y col., 1987). Por otro lado, el FGF2 también participa en la reparación de tejidos, en la curación de heridas, y en la hematopoyesis (Finklestein y col., 1988). Otra de las implicaciones que se ha demostrado esencial el FGF2 es en el mantenimiento de las funciones de las neuronas post-mitóticas derivadas del córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, retina, células ganglionares, y de la médula espinal (Pettman y col., 1986).

En todas las formas de bFGF falta una secuencia de señal necesaria para su secreción a través del aparato de Golgi. Los primeros estudios postulaban que la liberación del factor al medio se realizaba directamente por lisis celular (Gajdusek y col., 1989) (Brooks y col., 1991). Estudios recientes apoyan que el bFGF es liberado en pequeñas cantidades utilizando vías atípicas de exocitosis aún no determinadas. Después de su secreción el bFGF es secuestrado en el medio extracelular con funciones paracrinas y autocrinas (Florkiewicz y col., 1995) (Mignatti y col., 1992).

2.1.2.b- RECEPTORES Y SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN DEL bFGF.

La familia de los factores de crecimiento fibroblástico muestra cinco receptores que se unen a los distintos factores con diversas formas y afinidades. Cuatro de los receptores son transmembrana con actividad tirosín quinasa (Jake y col., 1992) (Jonhson,1993), y el quinto es un receptor sin actividad quinasa (Burrus y col., 1992).

Los cuatro receptores tirosin quinasa muestran una estructura similar: una región extracelular que contiene tres dominios inmuglobulínicos, una región transmembrana, y una región intracelular constituida por un dominio yuxtamembrana y otro con actividad tirosín quinasa (Lee y col., 1989). (Figura 12).

Existen diferentes formas de estos receptores que se generan por mecanismos de *splicing* alternativo, que muestran diferentes afinidades para el ligando (Werner y col., 1992).

La unión del ligando al receptor produce su dimerización y autofosforilación (Figura 13) (Mohammadi y col., 1996). La activación del receptor produce la fosforilación de Shc y de FRS2. Estas proteínas a su vez, se unen y fosforilan a grb-2 y sos, que activan la cascada ras. Finalmente se inicia la transcripción del gen FGF2 (Kouhara y col., 1997) (Wang y col., 1996).

2.1.2.c- INTERACCIONES DE bFGF.

La unión de bFGF a los heparansulfatos presentes en las membranas celulares y en la matriz extracelular, favorece sus acciones biológicas. Entre otras destacan:

1. Los heparansulfatos protegen al bFGF de la proteólisis (Saksela y col., 1988).
2. El bFGF unido a los heparansulfatos funcionan como reserva del factor de crecimiento (Flaumenhaft, y col., 1990).
3. Permite la localización del factor y limita su difusión tisular (Flaumenhaft y col., 1990).
4. Los heparansulfatos solubles transportan al bFGF permitiendo su difusión más allá del lugar de secreción (Flaumenhaft y col., 1990).
5. La unión del FGF2 a los heparansulfatos de la superficie celular permite su internalización en la célula, limpiando la superficie de un posible exceso de FGF2 (Roganhi y col., 1992).

Además de estas acciones, se ha demostrado que los heparansulfatos y la heparina aumentan la afinidad de FGF2 por su receptor (Roganhi y col., 1994). Se forman complejos trimoleculares de FGF2-receptor-heparansulfato que son más estables que la unión del factor y del receptor aislados (Nugent y col., 1992).

2.1.2.d- FUNCIONES ANGIOGÉNICAS DE bFGF.

El bFGF es un factor angiogénico que induce la proliferación, migración y diferenciación de las células endoteliales (Folkman, 1987).

El bFGF participa en el proceso de angiogénesis también a nivel de regular la actividad de moléculas de la matriz extracelular, como colagenasas, proteinasas, activadores del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) y integrinas de la superficie celular (Inger y col., 1991).

El bFGF estimula en las células endoteliales la secreción de uPA y colagenasa, produciendo la degradación de la membrana basal capilar, y la estimulación de su migración en el proceso de angiogénesis (Folkman, 1982).

Por otro lado, el bFGF estimula la diferenciación, crecimiento, y capacidad invasiva de los tumores urológicos, y está implicado en el cáncer de próstata, de vejiga urinaria y riñón (Basilico y col., 1992). El bFGF estimula la producción de uPA y proteinasas que modulan la capacidad de invasión de las células tumorales (Miray-López y col., 1986).

En el proceso de angiogénesis tumoral, VEGF estimula en las células endoteliales la producción del bFGF, aumentando la actividad angiogénica por mecanismos autocrinos y intracrinos (Ferrara y col., 1992).

2.1.2.e- FUNCIONES DE bFGF EN LA PRÓSTATA.

El bFGF es producido principalmente por los fibroblastos, y estimula su crecimiento de forma autocrina (Story y col., 1987). Además, las células estromales de la glándula prostática tienen un papel clave como mediadoras de los efectos androgénicos, induciendo la proliferación y citodiferenciación del epitelio secretor prostático (Cunha y col., 1987). Las interacciones entre el epitelio y el estroma son fundamentales para el control y mantenimiento de la estructura y función del epitelio prostático, estando implicadas en el desarrollo de la hiperplasia prostática benigna.

Por otro lado, en cultivos de líneas celulares de próstata se ha evidenciado que el bFGF estimula el crecimiento de las células epiteliales de forma paracrina (McKeehan y col., 1987). Las células estromales aumentan la secreción de factores de crecimiento, que a su vez incrementan la proliferación de las células epiteliales prostáticas (Figura 14) (Swinnen y col., 1990) .

Por último, se ha relacionado a bFGF con la progresión del cáncer de próstata. El bFGF induce en las células endoteliales la síntesis de activadores del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), favoreciendo así la degradación de la matriz extracelular. En las líneas celulares DU145 y PC3, el aumento en la expresión de uPA se ha correlacionado con fenotipos más agresivos (Saksela y col., 1987).

2.1.3-RECEPTORES DE VEGF (VEGFR1) (VEGFR2).

En 1990 fueron identificados dos sitios de unión para VEGF en la superficie de células endoteliales bovinas (Vaisman y col., 1990) (Ploüet y col. 1990).

Posteriormente, estudios autoradiográficos realizados en ratones revelaron la presencia de estos receptores en grandes y pequeños vasos del tejido fetal y adulto (Jakeman y col., 1992). La detección más temprana de esta unión se observa durante el desarrollo embrionario en los hemangioblastos de los islotes vasculares del saco vitelino. Posteriormente se localiza en células endoteliales proliferantes y también en células endoteliales quiescentes (Jakeman y col., 1993).

La familia de receptores de VEGF esta compuesta por tres miembros (Figura 15):

- VEGFR-1 o Flt-1/ fms-like tirosin kinase
- VEGFR-2 o Flk/ KDR
- VEGFR-3 o Flt-4

Los principales receptores de VEGF son dos: VEGFR-1 o Flt-1/ fms-like tirosin kinase (De Vries y col., 1992) y VEGFR-2 o Flk/ KDR (Terman y col., 1992). Ambos receptores se localizan en el endotelio vascular y muestran gran afinidad por VEGF. Constan de un dominio extracelular, constituido por siete dominios inmunoglobulínicos, una región transmembrana, y un dominio intracelular con actividad tirosín quinasa (Figura 16)(Shibuya y col., 1990) (Terman y col., 1990).

VEGFR-1 muestra mayor afinidad por VEGF 165 que los otros receptores. Es una glicoproteína transmembrana de 180 Kd de peso molecular. VEGFR-1 puede generar por splicing una proteína soluble, que no contiene el séptimo dominio inmunoglobulínico, ni los dominios transmembrana y intracelular (De Vries y col., 1992).

VEGFR-2 muestra menor afinidad por VEGF y pesa 230 Kd (Terman y col., 1992). El factor de crecimiento vascular B (VEGF-B) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) se unen solamente a VEGFR-1. Mientras que VEGF-C y VEGF-D pueden unirse a VEGFR-2 y VEGFR-3.

VEGFR-3 o Flt-4, se localiza exclusivamente en el endotelio de vasos linfáticos, y no muestra afinidad por VEGF (Pajusola y col., 1992). VEGFR-3 sufre después de su biosíntesis, una rotura por proteólisis que genera dos cadenas proteicas unidas por puentes disulfuro (Galland y col., 1992).

Estudios recientes han revelado que VEGF se une al segundo dominio inmunoglobulínico extracelular de los receptores, aunque son necesarios los tres primeros dominios para mantener la afinidad (Davis-Symth y col., 1996).

La unión de VEGF al receptor produce su dimerización con otro miembro de la familia de receptores. Posteriormente, se produce la autofosforilación de residuos de tirosina en el dominio intracelular del receptor (Neufeld y col., 1999). Estas fosfotirosinas sirven de unión para otros sustratos, iniciando una cascada de señales intracelulares. Esta cascada modula la activación de varias proteínas de señales de transducción, como la protein quinasa mitógeno-activada (MAPK), que activa la transcripción genética en el núcleo y induce múltiples respuestas celulares que incluyen alteraciones de la permeabilidad vascular, quimiotaxis, y acciones sobre el crecimiento celular (Figura 17) (Guo y col., 1995).

Diversos estudios han demostrado que VEGFR-1 y VEGFR-2 producen diferentes señales de transducción (Waltenberger y col., 1994) (Seetharam y col., 1995). VEGFR-2 es el principal receptor, y es necesario para que VEGF produzca sus efectos mitógenos y de quimiotaxis. Diversos estudios han demostrado, que la transfección de un plásmido codificante para VEGFR-2 a células endoteliales porcinas permite que VEGF aumente la proliferación celular y la quimiotaxis. En cambio, la transfección de VEGFR-1 no produce que VEGF pueda ejercer sus principales acciones biológicas sobre la célula endotelial. VEGFR-2 tiene una importancia crítica para que VEGF pueda desarrollar sus acciones biológicas.

2.1.3.a- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VEGFR-1 Y VEGFR-2

La expresión de VEGFR-1 y VEGFR-2 se localiza principalmente en el endotelio vascular. Ambos receptores poseen en la región del promotor una secuencia que permite su unión específica a las células endoteliales (Morishita y col., 1995) (Patterson y col., 1995).

La hipoxia es el principal regulador de la expresión de VEGF y de sus receptores, aunque en diferentes estudios parecen existir diferencias en su regulación. Estudios *in vivo* han demostrado que en tejidos con baja pO₂ aumenta la expresión de VEGFR-1 y VEGFR-2 (Tuder y col., 1995). Mientras que, estudios *in vitro* han revelado que la hipoxia aumentaría la expresión de VEGFR-1 pero no de VEGFR-2. Incluso se ha observado una disminución de la expresión de VEGFR-2 (Takagi y col., 1996). Estos resultados podrían ser explicados por la ausencia de un factor paracrino que estaría presente *in vivo* en los tejidos isquémicos, y que aumentaría la expresión de VEGFR-2 (Brogi y col., 1996).

Además, se ha descubierto que VEGFR-1 muestra una secuencia de 430 pb en el promotor que es responsable de su activación transcripcional en condiciones de hipoxia. Parece ser que esta región está ausente en VEGFR-2 (Gerber y col., 1997).

Por último, otras citoquinas y factores de crecimiento también participarían en la regulación de los receptores. Así, se ha demostrado que TNF α y TGF β son capaces de inhibir la expresión de VEGFR-2 en cultivos de células endoteliales (Mandriota y col., 1996).

2.1.3.b- EXPRESIÓN DE VEGFR-1 (Flt-1) Y VEGFR-2 (FLK/KDR) EN LA EMBRIOGÉNESIS.

La proliferación vascular es fundamental en el desarrollo embrionario, el crecimiento y diferenciación de los tejidos, y en una gran variedad de procesos fisiológicos, como, la curación de las heridas y en funciones de reproducción.

VEGFR-1 y VEGFR-2 son esenciales para el desarrollo del sistema vascular. Mutaciones homocigotas para VEGFR-1 en embriones de ratón, son letales entre los días 8,5 y 9,5 del desarrollo (Fong y col., 1995). Observándose defectos en la organización de las células endoteliales en la formación de canales vasculares. De forma similar la inactivación del gen de VEGFR-2 provoca una ausencia de desarrollo vascular, y también es letal entre los días 8,5 y 9,5 del desarrollo (Shalaby y col., 1995).

VEGFR-2 se expresa en el saco vitelino y en el mesodermo embrionario. Posteriormente, en los angioblastos, el endocardio, y el endotelio de grandes y pequeños vasos (Quinn y col., 1993). VEGFR-2 es el marcador más temprano de la células endoteliales, y es fundamental en el proceso de vasculogénesis (Millauer y col., 1993).

En modelos animales de ratón, VEGFR-1 ha sido detectado selectivamente en las células endoteliales de tejidos embrionarios y adultos. La expresión de VEGFR-1 en células endoteliales quiescentes apoya un papel del receptor en el mantenimiento y supervivencia de dichas células (Peters y col., 1993).

2.1.3.c- EXPRESIÓN DE VEGFR-1 Y VEGFR-2 EN LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL.

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es producido por las células tumorales, y actúa sobre los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 localizados específicamente en el endotelio de los vasos tumorales (Kaipainen y col., 1995) (Wilting y col., 1996). VEGF actúa sobre los receptores vasculares de forma paracrina. Estos receptores pueden ser expresados de forma aberrante por las propias células tumorales, como se ha observado en casos de melanoma y de angiosarcoma (Figura 18) (Liu Y col., 1995) (Fiedler y col., 1997).

Se ha observado que VEGFR-2 muestra una mayor expresión en el endotelio de la periferia tumoral, mientras que VEGF se expresa principalmente alrededor de las zonas necróticas. Las hipoxia tisular aumenta la expresión de VEGF, que a su vez aumenta la expresión de VEGFR-2 en el endotelio (Kremer y col., 1997) (Plate y col., 1992).

Por otro lado, la expresión de VEGF y de sus receptores se correlaciona en muchos tumores con el grado de vascularización, como en carcinomas uroteliales (Brown y col., 1993 y 1995), tumores cerebrales (Hatva y col., 1995), cáncer colo-rectal (Takahashi y col., 1995), y otros, siendo en algunos casos indicadores pronósticos del riesgo de desarrollar metástasis y de la supervivencia (Weidner, 1993 y 1995).

2.2- VASCULOGÉNESIS Y REMODELAMIENTO ANGIOGÉNICO.

El límite para la difusión de oxígeno en los tejidos se halla entre 100 y 200 μm (Folkman, 1971). Más allá de esta distancia las células necesitan crear nuevos vasos, mediante el procesos de vasculogénesis, o de angiogénesis, para la obtención de oxígeno y nutrientes para su supervivencia (Carmeliet y col., 2000).

El proceso de angiogénesis es complejo, y está estrictamente regulado por múltiples vías independientes (Yancopoulos y col., 2000). A pesar de que la angiogénesis es un fenómeno marcadamente activo durante la embriogénesis y el desarrollo de los tejidos, en el adulto está restringida a procesos fisiológicos como el ciclo menstrual y la curación de heridas (Kerbel, 2000).

La formación de nuevos vasos puede producirse mediante diferentes procesos. En el desarrollo temprano del embrión el proceso de formación de vasos es denominado **vasculogénesis** (Yancopoulos, 2000). En la vasculogénesis las células endoteliales sufren un porceso de proliferación y diferenciación *in situ*, en un tejido previamente avascular. Posteriormente, por coalescencia se produce la formación de una red de túbulos primitivos. En esta red primaria, se observan los grandes vasos como la aorta y venas de gran calibre (Figura 19, estadio A).

En el proceso de **remodelación angiogénica** esta red inicial o primitiva es modificada, por gemación y engrandamiento de los vasos ya existentes, para formar una red de vasos interconectados característicos de la vasculatura madura (Figura 19, estadio B).

El proceso de **maduración vascular** incluye la integración de las células endoteliales en una matriz de soporte extracelular, y que los vasos neoformados se rodeen células de músculo liso y pericitos para conseguir su estabilización (Carmeliet y col., 2000). (Figura 19, estadio C).

Un proceso diferente, referido como **gemación angiogénica** (*angiogenic sprouting*), consiste en la formación de nuevos vasos a partir de una vasculatura pre-existente. Este proceso requiere de una previa “des-estabilización” de los vasos maduros que permite la gemación de nuevas estructuras vasculares (Figura 19, estadio D, F). A su vez, los vasos generados mediante este mecanismo también requerirán de una posterior maduración y estabilización vascular. Llegados a este punto y dependiendo de la presencia o ausencia de VEGF en el medio los vasos pueden sufrir una regresión, o bien se puede reiniciar el proceso de angiogénesis (Figura 19, estadio E).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es el factor crítico y decisivo que dirige el proceso de formación vascular. Es necesario durante el desarrollo embrionario, y en el adulto para iniciar la formación de vasos inmaduros, que posteriormente serán estabilizados por la acción de otros factores angiogénicos (Figura 19, estadio A y F).

Para que el proceso de formación vascular se produzca de una forma completa y eficaz, es necesaria la acción de factores que completan la angiogénesis iniciada por VEGF.

La angiopoyetina 1 (Ang1) y la efrina B2 (ephrin-B2) son requeridas para la remodelación y maduración de los vasos neoformados (Figura 19, estadio B y C). Se ha demostrado que en ausencia de Ang 1, las células endoteliales no son capaces de asociarse y interactuar con células de soporte, como los pericitos, impidiendo la estabilización de los vasos neoformados (Suri, 1996).

Después de la maduración vascular la angiopoyetina 1 continua siendo importante para mantener los vasos estables en estado quiescente (Figura 19, estadio C). El cese de las señales de estabilización coincide con el reinicio del proceso de remodelación vascular que se da en algunos tejidos del adulto, o en los tumores (Figura 19, estadio D).

Por otro lado, estudios recientes han revelado que las efrinas son importantes en el desarrollo del sistema vascular (Wang y col., 1998) (Adams, 1999). Así, la falta de expresión de efrina B2 y B4 en embriones de ratón, produce defectos fatales en la remodelación vascular, similares a la producida por la ausencia de Ang 1.

El nuevo modelo de angiogénesis tumoral es un equilibrio dinámico entre regresión y crecimiento tumoral, regulado por el VEGF y las angiopoyetinas.

En las fases iniciales de la angiogénesis tumoral se produce una “regresión “ de los vasos nativos en el tejido implicado, antes de que los nuevos vasos puedan desarrollarse mediante la expresión de VEGF (Sato, 1995)(Holash y col., 1999).

Este fenómeno ha sido extensamente estudiado utilizando modelos animales en los que se induce el desarrollo de focos metastásicos. Estos nuevos focos tumorales, parecen tener acceso a la red vascular mediante el “reclutamiento” de los vasos nativos ya existentes.

Como consecuencia de este reclutamiento, las células endoteliales aumentan la expresión de citocinas específicas, como la angiopoyetina-2 (Ang-2), por mecanismos aún desconocidos. La angiopoyetina-2 es producida por las propias células endoteliales, y actúa por un mecanismo autocrino sobre los vasos tumorales como un antagonista de los receptores Tie-2. Fue aislada en base a su homología con la Angiopoyetina 1. En los diferentes tipos celulares estudiados, la Ang 2 ha mostrado capacidad para activar o antagonizar a Tie 2 (Maisonpierre, 1997).

La expresión en ratones transgénicos de Ang 2 ha demostrado ser letal, observándose defectos similares a la falta de expresión de Ang 1 o Tie. Sugiriendo que Ang 2 puede actuar, en algunas circunstancias, como antagonista *in vivo* (Maisonpierre, 1997).

Diversos estudios han demostrado un incremento en la expresión de Ang 2 en vasos con mucha actividad de remodelamiento y de regresión vascular en tejido ovárico (Maisonpierre, 1997) (Goede y col., 1998), y en algunos tumores (Holash y col., 1999).

La función principal de la Ang 2, es la de producir la señal que conduce a la desestabilización vascular que aumenta la plasticidad de los vasos que permite iniciar de nuevo el proceso de angiogénesis y remodelación vascular (Figura 19, estadio D).

En ausencia de factores de crecimiento, fundamentalmente de VEGF, la desestabilización vascular conduce a la regresión de los vasos por apoptosis de las células endoteliales (Figura 19, estadio E). En presencia de VEGF, se reiniciará el proceso de crecimiento vascular (Figura 19, estadio F).

En modelos animales en ratones afectados de glioma (GL261), se ha demostrado que la expresión de angiopoyetina-2, la apoptosis de las células endoteliales y la involución vascular, preceden a la necrosis tumoral y al aumento en la expresión de VEGF inducido por la hipoxia tisular (Zagzag y col., 2000).

VEGF, angiopoyetinas y efrina B2, parecen recapitular sus respectivas acciones en el desarrollo del sistema vascular embrionario y en el remodelamiento vascular en el adulto. Se ha demostrado que la administración de estos factores de forma individualizada, permite que cada uno de ellos lleve a cabo una acción determinada, pero no se produce todo el proceso angiogénico de forma completa.

Así, la administración de VEGF puede iniciar la formación de vasos en modelos animales, pero los vasos neoformados son inestables, e hiperpermeables. En contraste, se requiere de la administración de angiopoyetina 1 para estabilizar y hacer resistentes los vasos neoformados (Carmeliet, 2000).

3. ANGIOGÉNESIS TUMORAL

La angiogénesis es reconocida actualmente como un proceso fundamental y crítico para el crecimiento de tumores sólidos y el desarrollo de metástasis. Gimbrone y col. en 1972, demostraron que el proceso de angiogénesis era necesario para el crecimiento de fragmentos de tumor o de grupos de células tumorales, implantadas en un tejido avascular como la córnea. Dichos implantes eran neovascularizados desde el limbo esclerocorneal, y su inhibición era capaz de detener el crecimiento tumoral.

Posteriormente, se observó que todo tumor que excede 2-3 mm de grosor, necesita la creación de nuevos vasos para su nutrición (Folkman 1987).

El proceso de angiogénesis se produce en la periferia de la lesión tumoral, y está constituida por células normales derivadas del huésped (Weidner 1993). Esta zona de vasos neoformados es infiltrada posteriormente por las células tumorales.

3.1- ADQUISICIÓN DEL FENOTIPO ANGIOGÉNICO EN LAS CÉLULAS TUMORALES.

Cuando las células progresan hacia el fenotipo tumoral adquieren dos características fundamentales :

- La capacidad de multiplicarse sin restricciones.
- Y la capacidad de crear un medio favorable para la nutrición de la población tumoral en crecimiento (Carmeliet, 2000).

En condiciones de normalidad las células son fundamentalmente anti-angiogénicas. Producen gran cantidad de sustancias inhibitoras de la angiogénesis, y una escasa cantidad de sustancias inductoras de la angiogénesis (Bouck y col., 1996).

En el proceso de adquisición del fenotipo tumoral, las células crean su propio medio favorable al crecimiento y nutrición celular, mediante la producción de factores angiogénicos debido a la activación de diversos oncogenes.

Simultáneamente se produce una disminución en la síntesis de factores anti-angiogénicos debido a la pérdida o inactivación de genes supresores tumorales.

El balance final será la estimulación de la angiogénesis que favorecerá el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis a distancia.

CÉLULA NORMAL

↑ ANTI-ANGIOGÉNESIS

↓ ANGIOGÉNESIS

CÉLULA TUMORAL

↑ ANGIOGÉNESIS

↓ ANTI-ANGIOGÉNESIS

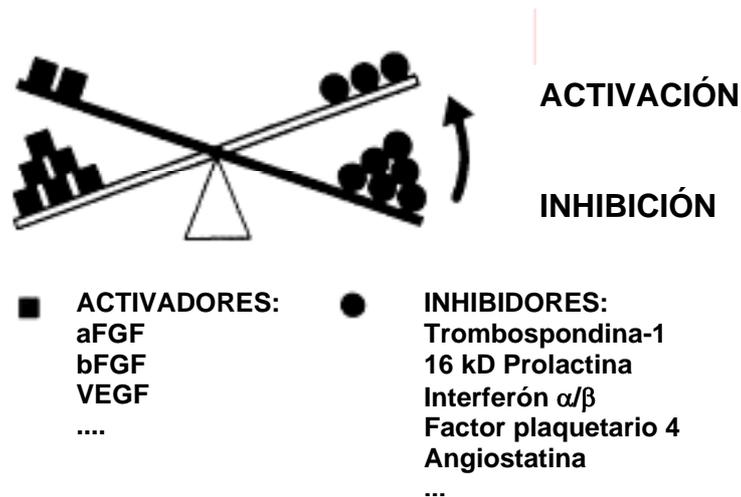
Los tumores se desarrollan a partir de tejidos normales, donde no suele existir una actividad angiogénica significativa, y los vasos se hallan en un estado quiescente. Existe un equilibrio entre factores inductores de la angiogénesis y factores inhibidores que en el tejido normal se mantiene a favor de un predominio de la inhibición.

Cuando las células normales progresan al fenotipo tumoral, este equilibrio cambia hacia un predominio de sustancias pro-angiogénicas o estimuladoras de la angiogénesis (Bouck y col., 1996).

Este cambio se produce por dos mecanismos principalmente (Figura 20):

- Por una disminución de factores inhibidores de la angiogénesis.
- Por un aumento de factores pro-angiogénicos.

Figura 20. Representación esquemática sobre la hipótesis de la existencia de un equilibrio entre sustancias pro-angiogénicas y anti-angiogénicas, y el inicio del proceso de angiogénesis.



Las células tumorales utilizan ambos mecanismos para favorecer el desarrollo de nuevos vasos (Dameron, 1994). En estudios *in vitro* se ha observado que la estimulación de la proliferación de células endoteliales y el quimiotactismo generados por VEGF y bFGF, se inhiben al incrementar la presencia en el medio del inhibidor Trombospondina-1 (TPS-1) (Good y col., 1990) (Rastinejad y col., 1989). Esto sugiere que cuando los niveles del inhibidor son suficientemente altos las señales estimuladoras de la angiogénesis son sobrepasadas, y el equilibrio se desplaza hacia una inhibición del proceso.

3.2- MECANISMOS DE LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL

Los tumores producen diversos factores angiogénicos que actúan en los receptores de pequeños vasos que rodean a las células tumorales (Folkman 1987). A su vez la célula endotelial activada promueve su propio crecimiento y la neoformación vascular.

Además de la síntesis de factores angiogénicos las células tumorales atraen la formación de nuevos vasos mediante los siguientes mecanismos :

1. Elaboración de enzimas de digestión de la matriz extracelular: que permiten la liberación de factores angiogénicos secuestrados en el medio, y facilitan la invasión por parte de nuevos vasos (Cherrington y col., 2000).

2. Producción de factores quimiotácticos: que atraen a macrófagos, mastocitos, y linfocitos, que mediante su estimulación producen a su vez mayor cantidad de sustancias pro-angiogénicas (Carron y col., 1998).
3. Estimulación de los fibroblastos del estroma: que también sintetizan factores pro-angiogénicos.

Las células endoteliales activadas también producen factores angiogénicos, como el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), que además de mantener la activación de la célula endotelial, actúa sobre la población tumoral por un mecanismo paracrino (Folkman, 1985).

Los vasos neoformados pueden estimular el crecimiento tumoral aumentando el índice mitótico, como se ha demostrado en modelos animales de cáncer de mama, y también pueden proteger a la población tumoral de la apoptosis mediante la síntesis de factores de protección, como el IGF-I, como se ha demostrado en modelos animales con el cáncer de pulmón y fibrosarcomas (O'Reilly, 1994) (Holmgren, 1995).

3.1-FORMACIÓN DE VASOS TUMORALES

Los vasos tumorales se forman por gemación (en inglés "sprouting") a partir de vasos pre-existentes, por intususpección, que consiste en la inserción de columnas de tejido intersticial en la luz vascular (Patan y col., 1996), o por otro mecanismo menos frecuente que consiste en que células precursoras endoteliales que se desprenden de la propia pared vascular o procedentes de la médula ósea, contribuyan al proceso de angiogénesis tumoral (Asahara y col., 2000) (Rafii, 2000).

La angiogénesis tumoral es un proceso complejo, estrictamente regulado, que comprende diferentes etapas:

1. Factores que promueven el inicio de la angiogénesis tumoral:

El proceso se inicia con la producción de factores de crecimiento angiogénicos liberados por las propias células tumorales y por las células del microambiente tumoral (Figura 21, A).

Existen una gran variedad de estímulos fisiológicos y patológicos que favorecen la síntesis de factores de crecimiento. La producción de VEGF se produce en respuesta a diversos estímulos:

- Debido a la secreción de proteínas por el microambiente tumoral: el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Tsai, 1995), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (Tsai, 1995), el factor de crecimiento insulínico (IGF) (Akagi, 1998), la interleukina I β (IL-I β) (Akagi, 1999), la interleukina 6 (IL-6) (Cohen, 1996), y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (Potapova, 1996).
- Situaciones de estrés celular por hipoxia (Shweiki, 1992), pH bajo, y/o hipoglucemia (Shweiki y col., 1995).
- Estrés mecánico por la presión de las células tumorales en proliferación (Carmeliet, 2000).
- Como respuesta inflamatoria, por la presencia de ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Tsujii y col., 1998), o la síntesis de prostaglandinas (Form, 1983), y por la activación de los mastocitos (Coussens y col., 1999).
- Debido a alteraciones genéticas, como por la activación del oncogen ras y src (Grugel y col., 1995) (Rak, 1995), o por pérdida de genes supresores tumorales, como p53 y von Hippel-Lindau (VHL) (Kieser y col., 1994) (Iliopoulos y col., 1996).

2. Activación de las células endoteliales:

Las células endoteliales maduras de vasos en estado quiescente tienen índices de proliferación celular característicamente bajos con un recambio celular que se ha estimado en años. En el proceso de neovascularización la proliferación de las células endoteliales aumenta de forma dramática. En el modelo Lewis de cáncer de pulmón, se observó que el índice proliferativo de

las células endoteliales aumentaba hasta el 40 %, evidenciándose un nivel elevado de recambio celular (Holmgren y col., 1995).

Los índices de proliferación de las células endoteliales calculados en diversos modelos tumorales han revelado recambios celulares de 1 día a 10 días. Este hecho contrasta con el recambio normal del endotelio en tejidos normales que varía de los 80 días en el pulmón, a 8.000 días en el cerebro (Hobson y col., 1984).

La activación de las células endoteliales se produce principalmente en respuesta a : VEGF, FGF Y PDGF (Figura 21, B).

VEGF tiene múltiples efectos sobre el endotelio, iniciando directamente la angiogénesis, mediante la estimulación de la proliferación (Bernatchez y col., 1999), migración (Pepper y col., 1992), y gemación celular a partir de vasos pre-existentes (Nicosia y col., 1994).

De forma indirecta VEGF contribuye a la angiogénesis aumentando la permeabilidad vascular (Conolly y col., 1989) (Dvorak y col., 1995), induciendo la expresión de metaloproteinasas en la matriz extracelular, y de diversos enzimas que digieren dicha matriz, facilitando la migración de las células endoteliales (Unemori y col., 1992).

A su vez, VEGF, induce la expresión en el endotelio de moléculas de adhesión como las integrinas, que participan en las interacciones y migración de las células (Friedlander y col., 1995).

FGF también ejerce diversos efectos sobre las células endoteliales, estimulando la expresión de VEGF de forma autocrina y paracrina. Aunque también es capaz de estimular la angiogénesis por mecanismos VEGF independientes (Seghezzi y col., 1998).

FGF participa en la regulación de la migración de las células endoteliales, y estimula la síntesis de proteasas, como el factor activador del plasminógeno (Sato y col., 1988).

Además, FGF puede modificar la morfología del endotelio, mediante la producción de las integrinas $\alpha v \beta 3$ (Sepp y col., 1994) y $\alpha 2 \beta$ (Enestein y col., 1992), que son importantes en las interacciones entre células y con la matriz extracelular.

El PDGF, participa en la proliferación de las células endoteliales, en la formación de los túbulos vasculares (Battegay y col., 1994), y en la estabilización vascular a través de los pericitos (Lindahl y col., 1997). El PDGF aumenta la expresión de VEGF y de otros factores de crecimiento angiogénicos (Sato y col., 1993) (Enholm y col., 1997).

Las células endoteliales activadas producen diversas metaloproteinasas (MMP), fundamentalmente colagenasas y gelatinasas, que degradan la matriz extracelular (Cherrington y col., 2000), permitiendo la migración de las células y la formación de túbulos.

3. Proliferación, migración y diferenciación de las células endoteliales:

En el proceso de angiogénesis se producen una serie de cambios espacio-temporales en la deposición y distribución de los distintos componentes de la matriz extracelular que conducen a la formación de una membrana basal madura en los vasos neoformados.

Siguiendo a la degradación de la matriz extracelular, las células endoteliales inician su proliferación en respuesta a los factores de crecimiento, principalmente VEGF, producidos por el tumor. A continuación migran por quimiotactismo hacia el estímulo angiogénico (Figura 21, C).

A lo largo de un vaso neoformado se observa una variación de la composición de la matriz extracelular que rodea a las células endoteliales según la zona. Así, en la zona más distal del brote vascular las células muestran mayor proliferación y se rodean de colágeno tipo V y de fibronectina, mientras que en la región más proximal las células se estabilizan y recubriéndose de membrana basal compuesta por fibronectina, laminina 1 y colágeno de tipo IV (Form y col., 1986) (Figura 21).

Diversas moléculas de adhesión celular, como las integrinas, ayudan a la migración de las células endoteliales. Las integrinas son una amplia familia de proteínas transmembrana que se forman por heterodimerización de unidades alfa y beta. Existen más de 15 subunidades alfa distintas, y 8 subunidades beta. Estas subunidades forman 20 combinaciones distintas, de las cuales la más implicada en la angiogénesis es la integrina $\alpha v \beta 3$.

La migración de las células endoteliales se produce por la unión de las células a unos residuos de aminoácidos que quedan expuestos en la matriz por proteólisis del colágeno. Estos residuos de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) son reconocidos por la integrina $\alpha v \beta 3$ expresada en la superficie endotelial. La célula endotelial utiliza la unión RGD como una matriz provisional para desarrollar y coordinar su capacidad de adhesión y de invasión durante la angiogénesis (Carron y col., 1998).

La integrina $\alpha v \beta 3$ es crítica para la diferenciación, maduración y supervivencia de los vasos, y está presente en la superficie del endotelio activado, permitiendo la expansión de las células y la creación de nuevas vasculas (Drake y col., 1995).

4. Estabilización y maduración vascular:

La maduración de los nuevos vasos incluye la creación de una nueva membrana basal, y la estabilización de dichas estructuras vasculares por el recubrimiento de células de soporte, como las células musculares lisas de grandes vasos, o los pericitos en los capilares (Figura 21, D) (Hirschi y col., 1998).

Experimentos *in vivo* sugieren que los vasos que no alcanzan a rodearse de células de soporte, requieren VEGF para su supervivencia. Mientras que los vasos maduros y estables pueden sobrevivir en ausencia de VEGF (Hellström y col., 1999). El PDGF estimula el desarrollo y migración de los pericitos, contribuyendo así a la estabilización vascular. A su vez, VEGF y PDGF, actúan como potentes factores quimiotácticos atrayendo a las células musculares lisas (Grosskreutz, 1999) (Grotendorst y col., 1981).

Por otro lado, la angiopoyetina 1 es específica para las células endoteliales, con funciones de estabilización y mantenimiento de los vasos maduros, y promueve la interacción entre las células endoteliales y musculares lisas (Suri y col., 1998).

5. Supervivencia de las células endoteliales:

En el microambiente tumoral, las células endoteliales proliferantes pueden morir por apoptosis en ausencia de factores que estimulen la supervivencia celular (Figura 21, E) (Benjamin y col., 1999) (Kim y col., 2000).

Los principales factores que contribuyen a dicha supervivencia son: el VEGF, angiopoyetina 1 y las integrinas. La supervivencia de los vasos neoformados es VEGF-dependiente. En su ausencia se produce la muerte de las células vasculares por apoptosis (Alon y col., 1995) (Shaheen y col., 1999). También la angiopoyetina 1 ha demostrado ser un potente factor de supervivencia para las células endoteliales (Kim y col., 2000).

Por último, la unión de la integrina $\alpha v \beta 3$ a receptores de la matriz extracelular, como la vitronectina, el factor de von Willebrand, la fibronectina, y el fibrinógeno, producen señales que mantienen la supervivencia de las células vasculares en la angiogénesis, llevando a la diferenciación y formación de vasos maduros (Brooks y col., 1994) (Strömblad y col., 1996).

Los conocimientos actuales abren una nueva perspectiva en la inhibición del proceso de angiogénesis tumoral, mediante la desestabilización y regresión de los vasos neoformados con terapias dirigidas contra las células periendotheliales y otras moléculas de adhesión celular.

3.4- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS VASOS TUMORALES

Los vasos neoformados tumorales, difieren en algunos aspectos respecto de los vasos del tejido normal adyacente. Son más permeables al paso de sustancias, como lo demuestran diversos estudios ultraestructurales, que evidencian un mayor número de fenestraciones, aberturas, y vesículas, mostrando membranas basales discontinuas o incluso, ausentes (Hobbs, 1998) (Hashizume, 2000) (Dvorak y col., 1999). Suelen tener una morfología aberrante, con formación de ángulos rectos, y de gran número de dilataciones y de shunts arterio-venosos, que producen áreas de intensa hipoxia y pHs ácidos (Helmlinger y col., 1997). Estas zonas contribuyen a disminuir la eficacia en la llegada de drogas anti-angiogénicas, y seleccionan clonas de células tumorales resistentes a la hipoxia (Giaccia, 1996).

La pared de los vasos tumorales es un mosaico celular, formado en parte por células endoteliales y por células tumorales. Este hecho tiene importantes implicaciones en el desarrollo de metástasis, ya que las células tumorales tienen un acceso fácil al torrente circulatorio. Además, en la mayor parte de vasos tumorales falta la capa de células perivasculares que contribuyen a la estabilización y maduración vascular, y que permite acomodar el flujo sanguíneo según las necesidades metabólicas.

Estudios recientes han revelado una escasa presencia de pericitos y de células musculares lisas en los vasos tumorales. Además, existe una gran heterogeneidad en los distintos tumores respecto a la presencia de células periendotheliales. En un estudio se observó que en el glioblastoma el índice de asociación de pericitos con la microvasculatura era del 22,7 +/- 7,9 %, mientras que en el cáncer de mama fue del 67,3 +/- 4,2 % (Eberhard y col., 2000).

Estudios recientes atribuyen a los pericitos funciones en la estabilización de los vasos neoformados. Su presencia sería mayor en tumores de crecimiento lento y menor en tumores más agresivos. Un estudio con muestras tisulares de cáncer prostático, considerado un tumor de crecimiento lento, reveló la presencia de pericitos en un 40 % de los vasos, mientras que en secciones de glioblastoma multiforme era tan sólo del 25 % (Benjamín y col., 1999).

Las células endoteliales tumorales también difieren de las células endoteliales de la vasculatura normal en su gran heterogeneidad. Así, en algunas zonas tumorales se observa una elevada proliferación celular, mientras que en otras regiones del tumor las células endoteliales sufren apoptosis, acompañando a zonas de necrosis, y fenómenos de regresión vascular (Holash y col., 1999).

Las células endoteliales de los vasos tumorales se caracterizan por su "inestabilidad", pasando de estados hiperproliferativos a la apoptosis y regresión vascular. Las bases moleculares y celulares de esta inestabilidad están poco definidas.

Por otro lado, se observan alteraciones en la expresión de diversas moléculas de la superficie endotelial que alteran las interacciones con las células inflamatorias circulantes (Eliceiri y col., 1999) (Huang, 1997).

3.5- REGULACIÓN DE LA ANGIOGENESIS TUMORAL.

El proceso de angiogénesis tumoral esta regulado por factores que favorecen o inhiben la vascularización tisular. Los factores inductores de la angiogénesis son factores que pueden ser producidos por las células tumorales, y actúan directamente sobre los receptores de las células endoteliales, estimulando la creación de nuevos vasos.

En el anexo I se resumen los principales factores inductores de la angiogénesis in vivo que pueden ser sintetizados por las células tumorales

La mayoría son factores de crecimiento que actúan sobre las células endoteliales promoviendo la migración y proliferación celular. Los más potentes son proteínas, pero también se ha observado actividad angiogénica en algunos lípidos, como los leucotrienos y prostaglandinas, y en algunos carbohidratos como el lactato y en fragmentos de ácido hialourónico (Carmeliet, 2000).

De todos los factores angiogénicos los más potentes *in vivo* son el VEGF, el bFGF, y el TGF β .

La síntesis de factores angiogénicos aumenta en las células con la adquisición del fenotipo tumoral. A veces este incremento en la síntesis de sustancias inductoras no es suficiente para iniciar la angiogénesis, debido a que también existe una producción de sustancias inhibitoras por parte del tejido normal adyacente.

La activación de algunos oncogenes actúa estimulando la síntesis de moléculas que inducen o aumentan la neovascularización de los tejidos. Así, los oncogenes influyen en la angiogénesis mediante varios mecanismos :

- Algunos oncogenes codifican factores angiogénicos .
- Otros estimulan la producción de factores angiogénicos .

En el anexo II se resumen los principales factores angiogénicos que pueden actuar como oncogenes y de aquellos oncogenes que pueden aumentar la producción de factores angiogénicos.

Los oncogenes pueden estimular la síntesis de factores angiogénicos directamente, o por otros mecanismos más complejos. También pueden contribuir a la angiogénesis indirectamente, estimulando la producción o activación de enzimas que degradan la matriz extracelular y las membranas basales, facilitando así la liberación de factores angiogénicos secuestrados en el medio extracelular, como v-erb B que estimula en fibroblastos la síntesis de metaloproteinasas, o H-ras que aumenta la síntesis de uroquinasas y colagenasas (Bouck y col., 1996).

Por otro lado, las células de los mamíferos en condiciones normales producen una gran variedad de moléculas que son capaces de inhibir la angiogénesis *in vivo*. Este efecto sobre la inhibición de la angiogénesis ha sido demostrado en modelos experimentales en la córnea y en la membrana corio-alantoidea (CAM) (Bouck y col., 1996).

En el anexo III se detallan las substancias inhibidoras de la angiogénesis producidas por células normales de mamíferos .

Muchas de estas substancias también tienen capacidad de inhibir la angiogénesis en los tumores *in vivo*, como la angiostatina, interferones y interleuquinas, y la trombospondina-1 (Bouck y col., 1996).

La mayoría de las substancias inhibidoras de la angiogénesis son efectivas en la forma en que son secretadas. Pero, en algunos casos, son almacenadas de forma inactiva formando parte de moléculas de mayor tamaño, y se vuelven activas por la acción de enzimas de la matriz extracelular.

Las primeras observaciones sobre este mecanismo de activación se evidenciaron en 1985. Se demostró que un fragmento de fibronectina de 29 kD era capaz de inhibir la proliferación endotelial *in vitro*, mientras que la molécula de fibronectina intacta, que constituye un abundante componente del sistema circulatorio, no poseía en si misma, propiedades de inhibición (Homandberg y col., 1985). Posteriormente, un fragmento de 16kD de la prolactina, evidenció una inhibición de la angiogénesis, mientras que la molécula completa no comparte estas acciones (Clapp y col., 1993).

Más recientemente, la angiostatina, un potente inhibidor de la angiogénesis, ha sido identificada como un fragmento del plasminógeno (O'Reilly y col., 1994). El hecho que diversos componentes del sistema circulatorio, como la fibronectina y el plasminógeno, puedan ser convertidos en potentes inhibidores de la angiogénesis, sugiere una nueva forma de regulación, donde las proteasas tienen un papel crucial, al poder limitar el proceso de angiogénesis, mediante la liberación específica de moléculas inhibidoras.

Estas sustancias inhibidoras permanecerían almacenadas formando parte de otras proteínas circulantes (O'Reilly y col., 1994).

Algunos factores inhibidores de la angiogénesis disminuyen en la progresión tumoral (Dameron, 1994). En el glioblastoma multiforme se ha observado una disminución de Trombospondina-1 en casos de pérdida del cromosoma 10, observándose un incremento muy importante de la angiogénesis (Rastinejad, 1989).

Otras veces estos factores están aumentados, pero no son efectivos en el medio tumoral. Es el caso de tumores que demuestran en ensayos *in vivo* un aumento de inhibidores del plasminógeno de tipo 1, pero la angiogénesis no se inhibe (Damjanovich 1994).

La mayoría de **genes supresores tumorales** identificados actúan en el equilibrio de la angiogénesis produciendo sustancias inhibidoras (Bouck y col., 1996). La pérdida de estos genes supresores tumorales causa una disminución de factores inhibidores, y desplaza el equilibrio hacia un predominio de la angiogénesis.

En líneas de fibroblastos de hamster BHK inmortalizados con la pérdida de genes supresores tumorales, se observó una disminución de hasta el 90% en los niveles de Trombospondina 1, y posteriormente se produjo una activación de la angiogénesis (Bouck y di Mayorca, 1982).

También en fibroblastos activados procedentes de pacientes con síndrome de Li-Fraumeni, se demostró que la pérdida de p 53 originaba una disminución de los niveles de trombospondina 1, y un predominio de la angiogénesis (Dameron, 1994).

En el anexo IV se detallan los principales genes supresores implicados en la angiogénesis .

Por otro lado, un mismo gen supresor tumoral puede ejercer diversos efectos dependiendo del tipo de tumor. Así, el gen del RB, origina en el retinoblastoma y el osteosarcoma un fenotipo anti-angiogénico, pero en las líneas celulares de cáncer de próstata no consigue este efecto anti-angiogénico (Bookstein, 1990).

Otras veces el mismo gen supresor tumoral origina diferentes sustancias inhibitoras dependiendo del tipo celular donde se exprese. Es el caso de p53, que en fibroblastos induce la secreción de trombospondina 1, y en el glioblastoma otra sustancia desconocida que no es la trombospondina 1 (VanMeir, 1994).

Por último, la misma sustancia inhibitora puede ser producida por distintos genes supresores tumorales en diferentes tejidos. La Trombospondina 1 es inducida por el gen p53 en fibroblastos, y por otro gen supresor tumoral del cromosoma 10 en el glioblastoma multiforme (Hsu 1994).

3.6- CAMBIOS HACIA EL FENOTIPO ANGIOGÉNICO EN LA FASE PRE-NEOPLÁSICA.

El cambio hacia el fenotipo angiogénico en un tejido normal se inicia en un estadio precoz pretumoral, a nivel de los cambios displásicos de un epitelio.

En cultivos de células *in vitro* se ha demostrado (Bouck y col., 1996):

1. La pérdida de genes supresores tumorales disminuye la presencia de sustancias inhibitoras de la angiogénesis.
2. La activación de oncogenes incrementan los factores inductores de la angiogénesis.

Estudios *in vitro* realizados a partir de células extraídas de tejidos displásicos, demuestran un predominio de factores inhibitoras de la angiogénesis en los estadios precoces, para cambiar después hacia un predominio de sustancias inductoras (Carmeliet, 2000).

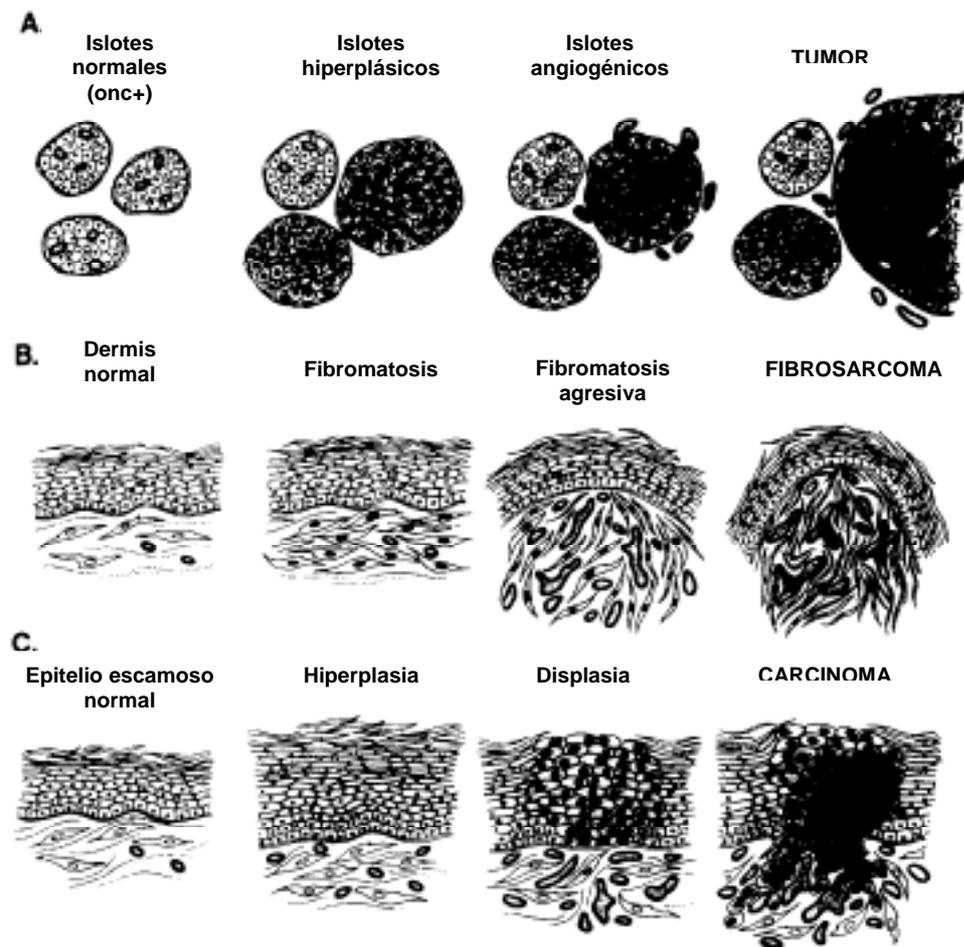
El proceso de angiogénesis en el estadio pre-neoplásico, ha sido estudiado utilizando ratones transgénicos portadores de determinados oncogenes, o con pérdida de genes supresores tumorales (Hanahan, 1996). En el modelo de ratón transgénico “RIP-Tag” portador del oncogen Tag (antígeno SU 40 T), se estimuló la expresión del oncogén en células β productoras de insulina de los islotes pancreáticos, evidenciándose actividad angiogénica en una fase pre-neoplásica de hiperplasia con cambios de carcinoma in situ (Figura 22, A). La actividad angiogénica fue medida en ensayos *in vitro*, cultivando conjuntamente en un gel células endoteliales y células procedentes de los islotes pancreáticos en distintos momentos evolutivos de la carcinogénesis (Hanahan, 1996).

En un segundo modelo de ratón transgénico se provocó el desarrollo de un fibrosarcoma dérmico mediante la infección con un papilomavirus bovino. Observándose, el inicio de la angiogénesis también en una etapa pre-neoplásica de fibromatosis agresiva (Figura 22, B).

Por último, en un tercer modelo de carcinogénesis, se evidenció actividad angiogénica en la lesión de carcinoma in situ, previa al desarrollo del carcinoma escamoso invasor (Figura 22,C).

Figura 22. El inicio del proceso de angiogénesis, ocurre en un estadio pre-neoplásico en los tres modelos tumorales con ratones transgénicos.

- (A) La expresión del oncogen Tag en los islotes pancreáticos produce una transformación tumoral que se desarrolla en cuatro etapas: normal con expresión del oncogén, hiperplasia de los islotes con signos histológicos de CIS, islotes angiogénicos, y carcinoma de los islotes pancreáticos.
- (B) En ratones transgénicos portadores del oncogén BPV-1, la dermis normal muestra inicialmente, una fibromatosis leve con acúmulos focales de fibroblastos. En el siguiente estado de fibromatosis agresiva, se observa angiogénesis, que persiste y aumenta en el fibrosarcoma protuberans ya establecido.
- (C) La expresión del oncogén HPV-16 en los queratinocitos basales, provoca el desarrollo de un carcinoma escamoso. En un inicio se observa hiperplasia del epitelio con un leve aumento de la densidad vascular. La angiogénesis aumenta en la displasia y el carcinoma invasor.



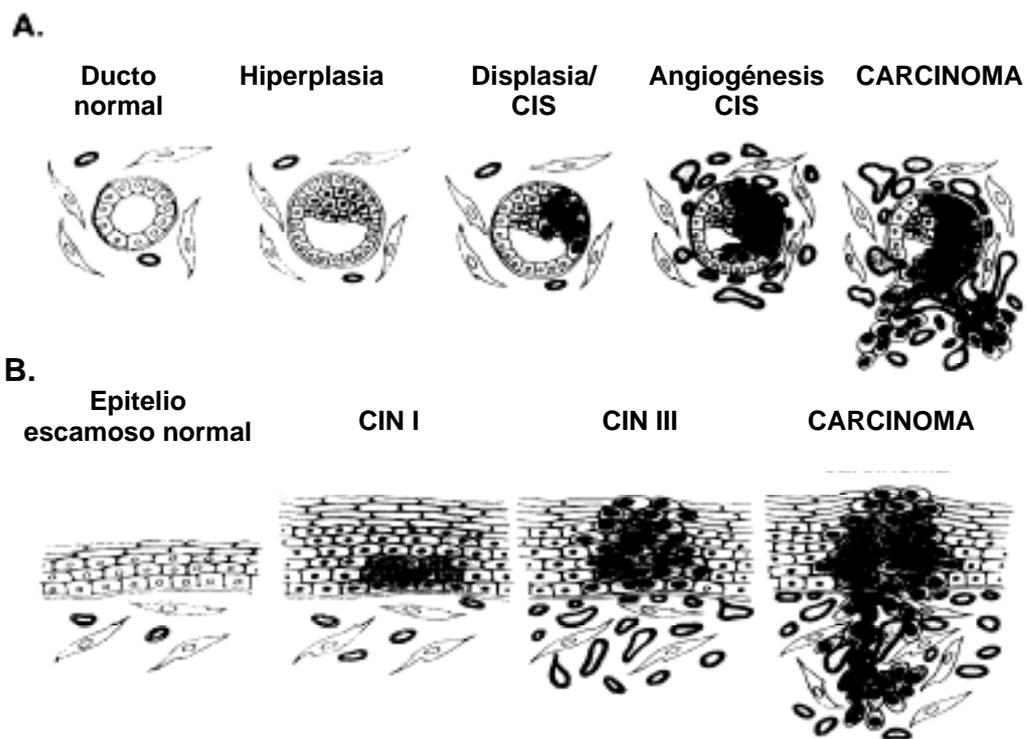
La utilización de marcadores inmunohistoquímicos vasculares, ha permitido detectar la actividad angiogénica en muestras de tejido humano parafinado.

Para el estudio de la angiogénesis en los tejidos, se utiliza el estudio de la densidad microvascular. Se ha podido detectar, un incremento progresivo del número de vasos en los tejidos displásicos respecto a los normales, para aumentar considerablemente en la lesión infiltrante.

Así, se ha evidenciado un incremento de densidad vascular alrededor de lesiones *in situ* de mama y de cérvix (Figura 23) (Weidner, 1992) (Smith-Cune, 1994).

Figura 23. Representación esquemática del inicio de la angiogénesis en lesiones precursoras de cáncer de mama y de cérvix.

- (A) En el proceso de carcinogénesis los conductos mamarios muestran una creciente atípia celular que evoluciona de la displasia y el CIS hasta el carcinoma, evidenciándose un incremento progresivo de la densidad de capilares que rodea los conductos mamarios.
- (B) El epitelio escamoso cervical presenta diversos grados de displasia epitelial (I-III), hasta el desarrollo del carcinoma invasor. La angiogénesis aumenta progresivamente de forma paralela al incremento en el grado de displasia epitelial, siendo máxima en el carcinoma.



También en el melanoma, se ha demostrado un incremento progresivo en la densidad vascular en el nevus displásico con respecto al no displásico, y mayor en el melanoma de crecimiento vertical u horizontal (Ribatti, 1992, Graham, 1994). El fenotipo angiogénico se desarrollaría de forma gradual. Así, en el momento en que las células cambian hacia el fenotipo angiogénico se producirían una serie de cambios a nivel genético, como la pérdida de genes supresores tumorales y la activación de oncogenes, que permiten romper el equilibrio entre sustancias inhibitoras y inductoras de la angiogénesis,

desplazándolo hacia un aumento de la angiogénesis. Este fenómeno se observaría ya en la lesión in situ o en la displasia.

Estos cambios a nivel genético implican a los mismos genes que son responsables de la desregulación del crecimiento celular. Por tanto, estrategias terapéuticas dirigidas a la inactivación de oncogenes o a restaurar la función de genes supresores tumorales, beneficiarían el control de la proliferación celular y de la angiogénesis.

4- ANGIOGÉNESIS Y PRÓSTATA.

4.1- ARQUITECTURA VASCULAR PROSTÁTICA.

Las primeras descripciones sobre la vascularización prostática fueron realizadas en 1934 por Bumpus y Antopol. Posteriormente, en 1956 Glegg y col. confirmaron estos primeros estudios y realizaron los principales trabajos sobre la arquitectura vascular prostática.

La glándula prostática recibe su irrigación arterial a partir de ramas de las arterias ilíacas internas. Estas arterias penetran las glándula en la parte súpero-lateral de forma bilateral, y se ramifican dentro de la cápsula prostática, extendiéndose por el parénquima prostático hacia la uretra (Glegg y col., 1956).

La próstata normal muestra tres zonas vasculares constituidas por vénulas, arteriolas y capilares que se distribuyen en el estroma fibromuscular de forma ordenada y regular. En la cápsula se observa una **zona periférica**, que muestra vasos ramificados en el tejido conectivo que rodea la glándula. A continuación una **zona intermedia** dónde los vasos tienen una distribución centrípeta hacia la uretra prostática. Y por último, una **zona periuretral**, que muestra un rico plexo vascular que rodea y nutre la propia uretra prostática (Glegg y col., 1956).

Los vasos de la zona capsular son de tipo arterial y trayecto tortuoso. Se organizan principalmente en dos grupos de vasos antero-laterales y otros dos postero-laterales (Figura 24). En la zona del ápex prostático, los dos grupos antero-laterales se unen para formar un solo grupo anterior. Además, en la parte posterior de la glándula se puede observar un grupo adicional de vasos de tamaño arteriolar o venular que se sitúa en la línea media con trayecto descendente.

Los vasos de la zona intermedia atraviesan la mayor parte del parénquima prostático rodeando con sus capilares a los acinos de la zona central y periférica. Se dirigen hacia la uretra prostática y muestran diferencias en su distribución en diferentes niveles de la glándula. Así, por debajo del meato urinario interno los capilares derivan del plexo antero-lateral, y muestran una distribución concéntrica entre las fibras de músculo liso que rodean la uretra. Por debajo de la cresta uretral, se observa una disminución en el número de vasos y de fibras musculares lisas, pero aumenta la vascularización que proviene de ricos plexos que rodean los conductos eyaculadores y el utrículo prostático.

Por último, los vasos del plexo uretral que irrigan la pared anterior uretral derivan de los vasos de la comisura anterior y tienen un trayecto vertical paralelo a la uretra, mientras que los vasos que irrigan la pared posterior derivan principalmente de las estructuras vasculares concéntricas del tejido periuretral.

4.2- ARQUITECTURA VASCULAR EN LA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL PROSTÁTICA (PIN) Y EN EL CARCINOMA INVASOR.

Los primeros estudios sobre la arquitectura vascular en el cáncer de próstata fueron realizados en 1993 por Bigler y col., que demostraron un aumento de la densidad vascular en el carcinoma prostático.

Otros estudios de Weidner y col., (1993) observaron una correlación entre la densidad vascular del cáncer prostático y el desarrollo de metástasis a distancia.

Posteriormente, Brawer y col. (1994) correlacionaron la densidad vascular con diversos factores pronósticos como el estadio patológico, y recomendaron su utilización en core-biopsias prostáticas como indicador de agresividad tumoral.

4.3- EXPRESIÓN DE FACTORES ANGIOGÉNICOS EN EL TEJIDO PROSTÁTICO.

Los resultados sobre la expresión de factores angiogénicos en el tejido prostático han sido variables. Los primeros trabajos se llevaron a cabo por Harper y col. (1996) utilizando métodos inmunohistoquímicos sobre tejido parafinado. Sus observaciones revelaron una expresión débil del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en el tejido normal y en la hiperplasia, y un aumento de su expresión en el adenocarcinoma prostático y las células neuroendocrinas.

Posteriormente, Ferrer y col. (1997) estudiaron la expresión de VEGF *in vivo* e *in vitro*. Evidenciando que la expresión de VEGF en el tejido benigno y hiperplásico era variable, con casos debilmente positivos y otros negativos.

Contrariamente, Jakson y col (1997) demostraron que la expresión de VEGF era constante e intensa en el epitelio, estroma y vasos de todos los casos con zonas de tejido prostático conservado. Sus resultados inmunohistoquímicos fueron contrastados en el mismo trabajo por PCR y Western-Blot.

En cuanto al factor angiogénico FGF2, se ha demostrado que las células estromales de la glándula prostática tienen un papel clave como mediadoras de los efectos androgénicos, induciendo la proliferación y citodiferenciación del epitelio secretor prostático (Cunha y col., 1987).

El FGF2 es producido principalmente por los fibroblastos, y estimula su propio crecimiento de forma autocrina (Story y col., 1987).

Además, en cultivos de líneas celulares de próstata se ha evidenciado que el FGF2 estimula el crecimiento de las células epiteliales de forma paracrina (McKeehan y col., 1987).

Por otro lado, los fibroblastos prostáticos son sensibles a los andrógenos mediante unos receptores. Se ha demostrado que los andrógenos potencian los efectos de FGF2 (Levin y col., 1992). Las células estromales aumentan la secreción de factores de crecimiento, que a su vez incrementan la proliferación de las células epiteliales prostáticas (Swinnen y col., 1990).

Las interacciones entre el epitelio y el estroma son fundamentales para el control y mantenimiento de la estructura y función del epitelio prostático, y son muy importantes en el desarrollo de la Hiperplasia prostática benigna (Story y col., 1987). Algunos investigadores sugieren que el proceso de hiperplasia se inicia con la proliferación de los fibroblastos, con posterior incorporación del epitelio ducto- acinar, y de células endoteliales y musculares lisas (Luo y col., 1991).

Por último, existen escasas referencias en la literatura acerca de la expresión de los receptores del principal factor angiogénico VEGFR1 (Flt-1) y VEGFR2 (Flk/KDR) en el tejido prostático no tumoral. Ferrer y col (1999) demostraron una ligera inmunexpresión de ambos receptores en el epitelio y vasos de áreas no tumorales. Curiosamente FLK/KDR se expresaba con mayor intensidad en las células basales de las glándulas hipertróficas.

Estas observaciones fueron corroboradas por el trabajo de Hahn y col. (2000), que mostró una expresión constante del receptor Flt-1 en el epitelio glandular y células endoteliales de tejido benigno a nivel de proteína y de ARN.

Además del factor angiogénico VEGF, el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF2) y sus receptores se expresan tanto a nivel de las células estromales, como de las células epiteliales del tejido prostático (Dow y col., 1997).

Por otro lado, el FGF2 que normalmente se sintetiza por los fibroblastos puede ser producido también por las células tumorales del cáncer de próstata. Así, se ha observado que diversas líneas celulares de cáncer de próstata (DU145, PC3, LNCaP) sintetizan cantidades variables de FGF2 y expresan también su receptor (Nakamoto y col., 1992).

Por último, se ha relacionado a FGF2 con la progresión del cáncer de próstata. El FGF2 induce en las células endoteliales la síntesis de activadores del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), favoreciendo así la degradación de la matriz extracelular (Saksela y col., 1987).

En las líneas celulares DU145 y PC3, el aumento en la expresión de uPA se ha correlacionado con fenotipos más agresivos. Se postula que en la adquisición del fenotipo invasivo las células aumentarían de forma importante la expresión de FGF2 (Nakamoto y col., 1992).

La expresión de ambos receptores en la población tumoral y endotelial sugieren un mecanismo de acción de VEGF paracrino sobre el endotelio y autocrino en las mismas células neoplásicas que lo producen. El proceso de angiogénesis parece estar implicado en gran variedad de procesos patológicos que afectan a la glándula prostática, desde la hiperplasia glandular benigna al carcinoma prostático, pero existen escasas referencias en la literatura sobre el papel de los distintos factores angiogénicos en la neovascularización de los tumores prostáticos.

Objetivos

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.

Dado que la angiogénesis es un mecanismo primordial en el desarrollo y progresión tumoral, y basándonos en la existencia de estudios sobre angiogénesis en lesiones preneoplásicas y carcinoma *in situ* en las cuales se demuestra un aumento significativo de la neovascularización que sugiere que la actividad angiogénica tumoral ocurre independientemente de la invasión neoplásica, se plantea como **hipótesis de trabajo** la existencia de un patrón angiogénico evolutivo en las diversas etapas del desarrollo tumoral, desde una fase inicial premaligna como es la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado hasta el carcinoma invasor.

Para **comprobar** experimentalmente esta hipótesis, se han planteado los siguientes **objetivos** :

1. Estudiar la densidad vascular en las lesiones de PIN de alto grado, respecto a la glándula normal y al carcinoma invasor.
2. Evaluar la expresión y distribución tisular de los factores angiogénicos VEGF y bFGF, y de sus receptores Flt-1 y Flk/KDR en la lesión intraepitelial prostática de alto grado, en la glándula normal, y en el carcinoma prostático con diferentes grados de diferenciación.
3. Correlacionar los índices de proliferación celular y la angiogénesis mediante la detección de la expresión de Ki67/MIB1 en las lesiones precursoras de PIN y su progresión hacia el carcinoma.
4. Relacionar la densidad vascular con la expresión de los factores angiogénicos VEGF y bFGF, y de sus receptores Flt-1 y Flk/KDR.
5. Determinar si existe una correlación entre la angiogenesis tumoral y los parámetros clínico-patológicos de agresividad.

Material y Métodos

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

El material objeto del estudio se obtuvo a partir de 58 casos de prostatectomía radical por adenocarcinoma de próstata en estadio pT2 y pT3 sin tratamiento hormonal previo, procedentes del archivo de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona durante los años 1996-2001. Los datos clínico-patológicos se resumen en la tabla 8.

Se analizaron un total de 174 muestras correspondientes a :

- 58 adenocarcinomas prostáticos con diferentes grados de diferenciación.
- 58 lesiones de PIN de alto grado.
- 58 zonas de tejido prostático normal adyacente a la tumoración.

Todos los casos tenían un diagnóstico comprobado histopatológicamente en nuestra institución de adenocarcinoma de próstata, sobre material incluido en parafina. Se dispuso de material para la realización del estudio histopatológico y de estudios inmunohistoquímicos.

Se cuantificó la densidad vascular en el adenocarcinoma, en las áreas de PIN de alto grado, y en el tejido normal adyacente, previa inmunotinción con CD.34, y se valoró el índice de proliferación celular con el marcador Ki67/MIB-1 en los distintos patrones morfológicos. Así mismo se valoró la inmunoexpresión de VEGF, bFGF, y de los receptores Flt-1 y FLK/KDR a nivel del epitelio glandular, de los vasos y del estroma prostático en los diferentes patrones morfológicos.

3.1- OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.

Todos los casos fueron valorados en un microscopio óptico. Se obtuvieron distintas variables clínico-patológicas que se resumen en la tabla 9.

Tabla 9- Descripción de las variables clínico-patológicas.

| VARIABLE | CARACTERÍSTICAS |
|--|--|
| Edad | <ul style="list-style-type: none"> - Incluida en todos los casos, según el orden cronológico de presentación. - Variable cuantitativa discreta en el momento de la recogida de datos. |
| Grado Histológico | <ul style="list-style-type: none"> - Se utilizó el sistema de gradación de Gleason combinado ("score"). - Variable cuantitativa discreta en el momento de la recogida de datos. - Variable cualitativa dicotómica con el punto de corte en el patrón combinado 7, en diversas pruebas estadísticas. Este valor es el recomendado por la literatura más reciente de forma mayoritaria, considerando: por debajo de 7 como tumores de "bajo grado", y por encima de 7 como de "alto grado". |
| Estadio Tumoral | <ul style="list-style-type: none"> - Se utilizó el sistema de estadificación recomendado para el carcinoma de próstata por el American Joint Committee on Cancer (UICC), mediante la clasificación TNM (6º edición, 2003). - Los casos corresponden a carcinomas primarios localizados (pT2 ó pT3). - Variable cualitativa dicotómica. Las categorías corresponden a cada estadio tumoral. |
| Márgenes de Resección | <ul style="list-style-type: none"> - Se consideró margen positivo o afectado cuando se observaron células tumorales en contacto con la tinta que se utiliza para delimitar el margen quirúrgico durante el procesamiento macroscópico de la pieza. - Variable cualitativa dicotómica, en la cual una categoría contenía las muestras con margen libre, y la otra las muestras con margen afectado. |
| Invasión de Vesículas Seminales | <ul style="list-style-type: none"> - Solamente evaluado en casos con estadio pT3. - Se consideró las vesículas seminales como invadidas cuando se afectaba la capa muscular de la vesícula seminal y no tan sólo la adventicia. - Variable cualitativa dicotómica. Las categorías corresponden a la ausencia o presencia de invasión de vesículas seminales. |
| PSA pre-operatorio | <ul style="list-style-type: none"> - Se evaluó la última determinación sérica de PSA libre y total antes del tratamiento, y se calculó en cada caso el ratio PSA libre/ PSA total. - Variable cuantitativa continua, en el momento de la recogida de datos. |
| Progresión tumoral | <ul style="list-style-type: none"> - Se consideró progresión tumoral biológica la elevación del PSA postoperatorio por encima de 1 ngr/ml, tras un intervalo libre de enfermedad. |

3.2- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

Todas las muestras fueron fijadas en formol tamponado al 10 % durante 36 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron deshidratadas y parafinadas en un procesador V.I.P a 60° y en condiciones de vacío. Las determinaciones inmunohistoquímicas se realizaron sobre cortes histológicos de 4µm montados en cristales con carga electrostática.

Tras desparafinación e hidratación de los tejidos en alcoholes decrecientes, se realizó un desenmascaramiento antigénico con digestión enzimática con el uso de pepsina en el caso de VEGF, y mediante calor con el uso de tampón citrato pH 6 en olla a presión en el caso de FLK/KDR, CD.34, Ki67 y Flt-1. Para el estudio de bFGF no se realizó desenmascaramiento.

Tras el desenmascaramiento, se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0,03 % durante 5 minutos.

Se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios a temperatura ambiente. Frente a VEGF y el bFGF se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo (A-20 y 147, Santa Cruz Biotech., respectivamente) incubados durante 30 minutos a una dilución de 1/200. El anticuerpo contra VEGF reconoce el extremo aminoterminal de las isoformas de 121, 165 y 189 aminoácidos.

Para FLK/KDR se empleó un anticuerpo monoclonal de ratón (A-3, Santa Cruz Biotech.) y para el Flt-1 un anticuerpo policlonal de conejo (C-17, Santa Cruz Biotech.). Ambos anticuerpos fueron incubados también durante 30 minutos a una dilución de 1/100. Para el CD.34 se utilizó un anticuerpo monoclonal (BI-3C5, DAKO) incubado durante 60 minutos a una dilución de 1/100. Finalmente, para Ki67 se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón (082D de Biomeda), prediluido y incubado durante 60 minutos.

Tras lavados con PBS, se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con un polímero de dextrano (EnVision+, DAKO) marcado con peroxidasa específico para los anticuerpos primarios. La presencia de uniones antígeno-anticuerpo-polímero fue puesta en evidencia con 3-3' diaminobencidina como cromógeno. Las secciones se contrastaron ligeramente con hematoxilina acuosa de Mayer, deshidratadas y montadas de forma permanente.

Tabla 10- Resumen de los anticuerpos utilizados.

| ANTICUERPO | CLON | CASA COMERCIAL | DILUCIÓN | LOCALIZACIÓN |
|--------------|--------|---------------------|------------|----------------|
| anti-VEGF | A20 | Santa Cruz Biotech. | 1/200 | Citoplasmática |
| anti-bFGF | 147 | Santa Cruz Biotech. | 1/200 | Citoplasmática |
| anti-Flt-1 | C-17 | Santa Cruz Biotech. | 1/100 | Citoplasmática |
| anti-FLK/FDR | A3 | Santa Cruz Biotech. | 1/100 | Citoplasmática |
| CD.34 | BI-3C5 | DAKO | 1/100 | Citoplasmática |
| Ki67/MIB-1 | 082D | Biomeda. | prediluido | Nuclear |

Fueron realizados controles positivos en cada una de las determinaciones con una sección tisular de lesión de psoriasis, en la que se conocía previamente la expresión para VEGF, bFGF, Flt-1 y FLK/KDR. Como controles negativos fueron empleados sueros no inmunizados de ratón y de conejo sustituyendo al anticuerpo primario sobre la misma sección de control positivo.

Para Ki67 y CD.34 se empleó una sección histológica de una amígdala como control positivo.

3.3- DETERMINACIONES EXPERIMENTALES.

Las valoraciones se realizaron en un microscopio óptico (Olympus, CH2, CWHK 10X18L) a un objetivo de 4X para la identificación de los campos a estudio, y a un objetivo de 40X para la cuantificación de las muestras.

3.3.1- EXPRESIÓN DE VEGF, bFGF, Flt-1 y FLK/KDR.

Se procedió a la evaluación microscópica por dos patólogos entrenados, con una variabilidad interobservador del 5 %.

La valoración inmunohistoquímica se realizó mediante un método semicuantitativo, valorando en cada caso la extensión (porcentaje de células teñidas) y intensidad (0=ausente, 1=débil, 2=moderada, 3=marcada) de inmunotinción.

Para disminuir ostensiblemente la subjetividad de la valoración se empleó un *score histológico* obtenido de aplicar la formula:

$$\text{HScore} = 1 \times (\% \text{ débil}) + 2 \times (\% \text{ mod}) + 3 \times (\% \text{ intenso}) \quad (1,2)$$

Con ello se obtuvo un *score* que varia de 0 (inmunoexpresión nula) a 300 (máxima inmunoexpresión).

Este método de valoración inmunohistoquímico ha demostrado una buena correlación con los ensayos bioquímicos estándares que utilizan tejidos en fresco homogeneizados para la valoración y cuantificación del grado de expresión de receptores de estrógenos en el cáncer de mama (McClelland y col., 1990) (Vermeulen y col., 1996). Además, la utilización de *Hscore* ha demostrado una gran reproducibilidad entre observadores (Pertschuk y col., 1985) (Shimada y col., 1985) (Wilbur y col., 1992).

La visualización directa de la expresión proteica de los factores angiogénicos VEGF y bFGF, y de sus receptores Flt-1 y FLK/KDR, en el tejido prostático evita posibles errores de muestreo, y permita la valoración directa de la intensidad y distribución tisular en los distintos patrones morfológicos estudiados.

La obtención del *score histológico* nos ha permitido cuantificar el grado de expresión proteica de los factores estudiados, permitiendo establecer comparaciones estadísticas y evidenciar su expresión heterogénea en el adenocarcinoma, el PIN de alto grado y el tejido normal adyacente.

3.3.2- ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Se procedió a la cuantificación del porcentaje de actividad proliferativa en los distintos patrones morfológicos mediante la determinación inmunohistoquímica de la tinción nuclear para Ki67/MIB-1.

La proteína Ki67 tiene una vida media corta y su expresión es necesaria en la progresión del ciclo celular (Schulter y col., 1993). Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón (clona 082D) que detecta las células en fase G1 tardía, S, M y G2.

El análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo MIB-1/Ki67 es la técnica de elección para la valoración del índice de proliferación tisular en tejidos humanos parafinados. Diversos estudios han evidenciado una correlación significativa entre la expresión de Ki67 y el grado de malignidad y el pronóstico en diversos tumores (Ross y col., 1995) (Hall y col., 1990) (Bubendorf y col., 1996).

3.3.3- ESTUDIO DE LA DENSIDAD VASCULAR

Para la cuantificación de la densidad vascular se utilizó el método de conteo de puntos con una rejilla Chalkley (Olympus x250, *Chalkley grid area* 0,196mm²). (Fig.25).

Este método, reconocido por el Comité Internacional para la valoración de la angiogénesis en tumores sólidos (Vermeulen y col., 1996), consiste en una rejilla que contiene 25 puntos distribuidos al azar que se coloca sobre el ocular del microscopio. La cuantificación vascular en las áreas de tumor se efectuó en los cortes seleccionados y teñidos con CD.34, marcador altamente específico para las células endoteliales maduras, en los denominados *hot spots*, o puntos calientes del tumor. Estos puntos representan la zona de mayor densidad vascular del tumor y se localizan tras barrido a bajo aumento (X10). Con la rejilla Chalckley y realizando una rotación del ocular se hace coincidir el máximo de puntos con las vasos teñidos con CD.34 efectuando el conteo de positividad de inmunotinción coincidente (a 250X) estudiando para cada caso tres puntos calientes y obteniendo la media ponderada (Fig.26).

Para la cuantificación vascular del epitelio glandular normal y de las áreas de PIN de alto grado, se estudiaron tres zonas al azar evaluando el estroma situado entre glándulas en zonas alejadas del tumor.

Resultados

IV. RESULTADOS

4.1- ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.

4.1.1- EDAD.

Las muestras obtenidas a partir de piezas de prostatectomía radical, en las cuales se estudiaron tejido normal, lesiones de PIN de alto grado y adenocarcinomas prostáticos, corresponden a hombres con edades comprendidas entre los 48 y los 72 años. La edad media fue de 63,66 años, y la mediana de las edades de 64,00 años. La muestra estaba compuesta por un 25% de pacientes con edades inferiores a los 60,75 años y un 75% de pacientes con edades inferiores a los 67,25 años.

4.1.2- GRADO HISTOLÓGICO Y ESTADIO TUMORAL.

Se incluyeron en el estudio un total de 58 casos: 27 casos (46,6 %) con diagnóstico de adenocarcinoma de bajo grado (Gleason: 2-6), y 31 casos (53,4 %) con diagnóstico de adenocarcinoma de alto grado (Gleason: 7-10).

En cuanto al estadio tumoral, 26 casos fueron adenocarcinomas prostáticos organoconfinados (estadio pT2) y 32 fueron adenocarcinomas con extensión capsular o extracapsular (estadio pT3) representando el 44,8 % y el 55,2 % de las muestras, respectivamente.

4.1.3- MARGEN DE RESECCIÓN E INVASIÓN DE VESÍCULAS SEMINALES.

La mayoría de los adenocarcinomas prostáticos (45 de 58 casos) (77,6 %) no mostraban infiltración del margen de resección quirúrgico. Tan sólo se constató invasión tumoral del margen de resección en 13 casos (22,4 %).

La invasión de vesículas seminales fue valorado tan sólo en aquellos casos con estadio pT3 (32 casos).

En estos tumores no organoconfinados (pT3), la mayoría no mostraron invasión de vesículas seminales (81,25%). Tan sólo se observó invasión de vesículas seminales en 6 casos (18,75%), siendo los demás negativos.

4.1.4- PSA libre, total y ratio PSA libre/ total.

Se obtuvieron los valores de PSA total, libre y del ratio de PSA libre/ total en 56 de los 58 casos de adenocarcinomas prostáticos incluidos en el estudio. La media de valores de PSA total de la muestra fue de 12,00 (rango:1,50-57,00), del PSA libre de 1,31 (rango:0,10-8,40) y del ratio PSA libre/ total de 0,12 (rango:0,01-0,27).

El 75 % de los casos de adenocarcinoma mostraron niveles de PSA total inferiores a 15,67, PSA libre inferior a 1,70 y ratio de PSA libre/ total inferior a 0,16.

4.1.5- PROGRESIÓN TUMORAL.

Se registró la evolución de la enfermedad tras el tratamiento con prostatectomía radical y tratamiento hormonal, entre 1996 y 2003 en el Departamento de Urología del Hospital Vall d'Hebrón. Se obtuvo el seguimiento en 53 (91,4%) de los 58 casos iniciales. Se consideró como criterio de progresión tumoral el aumento del PSA total postoperatorio por encima de 1ng/ml. En la mayor parte de los casos no se evidenció progresión tumoral: 43 casos (74,1%). Tan sólo progresaron 10 de los 53 casos con seguimiento (17,2%).

Tabla 11- Resumen descriptivo de las variables clínico-patológicas incluidas en el estudio (media, * entre paréntesis valores mínimo y máximo).

| VARIABLE | |
|--|---------------------|
| Número de pacientes | 58 |
| EDAD | 63,66 (48-72)* |
| GRADO HISTOLÓGICO | |
| 2-6 | 27 (46,6%) |
| 7-10 | 31 (53,4%) |
| ESTADIO PATOLÓGICO | |
| pT2 | 26 (44,8%) |
| pT3 | 32 (55,2%) |
| MARGEN DE RESECCIÓN | |
| LIBRE | 45 (77,6%) |
| AFFECTADO | 13 (22,4%) |
| INVASIÓN DE VESÍCULAS SEMINALES | |
| AUSENTE | 26 (82,25%) |
| PRESENTE | 6 (18,76%) |
| PSA total | 12,00 (1,50-57,00)* |
| PSA libre | 1,31 (0,10-8,40)* |
| Ratio PSA libre/ total | 0,12 (0,01-0,27)* |
| PROGRESIÓN TUMORAL | |
| NO | 43 (74,1%) |
| SI | 10 (17,2%) |

4.2- ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.

Se estudió la relación de las diferentes variables clínico-patológicas, y se evidenció diferencias significativas ($p < 0,05$), o casi significativas ($p < 0,10$) en algunas ocasiones. La relación entre las variables fue directa en todos los casos.

4.2.1- GRADO HISTOLÓGICO Y EL ESTADIO TUMORAL.

Se evaluó en todos los casos de la muestra (58). La mayoría de los casos con bajo grado de Gleason (19 de 27) (70,4%) eran adenocarcinomas organoconfinados (pT2). Mientras que la mayoría de casos de alto grado (24 de 31) (77,4%) mostraban un estadio pT3. Como cabía esperar, se demostró una relación directa y muy significativa entre el grado de Gleason y el estadio tumoral ($p < 0,000$).

4.2.2- GRADO TUMORAL Y LA INVASIÓN DE VESÍCULAS SEMINALES.

Se evaluó en un total de 32 muestras en estadio pT3. Tan sólo se observó invasión de vesículas seminales en 6 casos (18,75%). Todos los casos con invasión de vesículas seminales correspondían a tumores de alto grado (6 de 6) (100%). Sin embargo, la mayoría de tumores de alto grado (18 de 24) (75%) no evidenciaron invasión de vesículas seminales. Se observó una relación entre el grado tumoral y la invasión de vesículas seminales aunque no fue significativa ($p = 0,296$).

4.2.3- GRADO TUMORAL Y EL MARGEN DE RESECCIÓN QUIRÚRGICO.

La mayoría de casos de bajo grado de Gleason (24 de 27) (88,9%), así como los casos de alto grado (21 de 31) (67,7%) no mostraban infiltración del margen de resección. Los casos en los que se evidenció invasión del margen (10 de 13) (76,9%) se correspondían con tumores de alto grado.

Por tanto, se evidenció una tendencia a un mayor grado de Gleason en los tumores con invasión del margen de resección que resultó ser casi significativa ($p=0,066$).

4.2.4- GRADO TUMORAL y el PSA total, PSA libre y el ratio de PSA libre/total.

Los tumores de alto grado mostraron en general unos valores de PSA superiores a los tumores de bajo grado. Así, el 75% de adenocarcinomas de alto grado observaron valores de PSA total iguales o inferiores al 19,50, mientras que en los de bajo grado los valores eran inferiores a 11,00. La media del PSA en los tumores de alto grado fue de 14,64 (rango:1,50- 57,00) y de 8,71 en los de bajo grado (rango:3,00-34,20). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas, demostrándose un aumento en el PSA total en los adenocarcinomas de alto grado ($p=0,048$).

Para el PSA libre los valores observados en los tumores de alto grado también fueron superiores a los tumores de bajo grado. La media fue de 1,62 en los tumores de alto grado (rango:0,10-8,40) y de 0,92 en los de bajo grado (rango:0,10-2,90), siendo las diferencias casi significativas ($p=0,05$).

Los valores del ratio de PSA libre/ total obtenidos en la muestra fueron similares en ambos grados histológicos. Así, la media del ratio en los carcinomas de bajo grado fue de 0,11 (rango:0,02-0,23) y en los carcinomas de alto grado de 0,13 (rango:0,01-0,27)($p=0,526$).

4.2.5- ESTADIO TUMORAL y el PSA total, PSA libre y el ratio de PSA libre/total.

Se evidenció un aumento significativo en los valores de PSA total en los tumores en estadio pT3 respecto a los pT2. Así, la media del PSA total en los tumores pT2 fue de 8,51 (rango:1,80-43,00), aumentando ostensiblemente en los tumores con pT3 con media de 14,61 (rango:1,50-57,00). Estas diferencias fueron estadísticamente muy significativas ($p=0,006$).

Para el PSA libre la media en los tumores pT2 fue de 0,94 (rango:0,10-2,80) y aumentaba a 1,59 (rango:0,10-8,40) en los tumores pT3, siendo las diferencias casi significativas ($p=0,090$).

En cambio, el ratio de PSA libre/ total disminuyó de 0,13 (rango:0,02-0,26) en los tumores pT2 a 0,11 (rango:0,10-0,27) en los pT3 ($p=0,476$).

4.2.6- MARGEN DE RESECCIÓN y el PSA total, PSA libre y el ratio de PSA libre/ total.

Se observó un aumento en los valores de PSA libre y total en el grupo de tumores con afectación del margen de resección ($n=13$). Así, la media del PSA libre fue de 1,28 (rango:0,10-8,40) y del PSA total de 11,45 (rango:1,50-57,00) en los tumores sin afectación del margen quirúrgico ($n=43$), y aumentaba a 1,42 (rango:0,40-2,90) y 13,80 (rango:5,20-34,20) en los tumores con afectación del margen de resección. En ambos casos las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,111$ y $p=0,082$).

Respecto al ratio de PSA libre/ total fue mayor en los tumores sin afectación del margen de resección (media:0,12, rango:0,01-0,27) que en el grupo de tumores con afectación del margen (media:0,11, rango:0,05-0,24) ($p=0,741$).

4.2.7- INVASIÓN DE VESÍCULAS SEMINALES Y EL PSA total, PSA libre y ratio de PSA libre/ total.

En los 26 casos de adenocarcinomas prostáticos sin invasión de vesículas seminales la media de PSA total y libre fue superior a la de los tumores con invasión (adenocarcinomas sin invasión de vesículas seminales: PSA total: 10,9 y PSA libre: 1,09) (adenocarcinomas con invasión de vesículas seminales: PSA total: 9,55 y PSA libre: 0,7). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p= 0,454$ y $0,562$, respectivamente).

Por otro lado, la media del ratio de PSA libre/ PSA total en los casos con invasión fue ligeramente superior respecto a los casos sin invasión (0,14 versus 0,10), aunque las diferencias tampoco fueron significativas ($p=0,595$).

4.2.8- PROGRESIÓN TUMORAL , GRADO HISTOLÓGICO Y ESTADIO TUMORAL.

Se demostró progresión tumoral en 10 de los 53 casos con seguimiento de progresión de la enfermedad. Nueve de los diez casos que progresaron eran adenocarcinomas prostáticos de alto grado, siendo las diferencias estadísticamente muy significativas ($p=0,006$).

Por otro lado, la mayoría de casos en estadio pT2 no evolucionaron (87,5%), y 7 de los 10 casos que progresaron correspondían a tumores en estadio pT3 pero las diferencias no fueron significativas ($p=0,281$).

4.2.9- PROGRESIÓN TUMORAL , MARGEN DE RESECCIÓN Y INVASIÓN DE VESÍCULAS SEMINALES.

El porcentaje de casos que progresaron en los casos con margen de resección afectado fue ligeramente superior a los casos sin afectación del margen (23,1% y 17,5%) sin ser estas diferencias significativas ($p= 0,655$). En cambio, en la mayoría de casos con invasión de vesículas seminales se observó progresión tumoral, 60,0 % frente al 14,6%, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,014$).

4.2.10- PROGRESIÓN TUMORAL , PSA total, PSA libre Y ratio del PSA libre/ total.

Se observó un incremento significativo del PSA total en los casos con progresión tumoral respecto a los que no progresaron ($p= 0,040$). Así, la mediana del PSA total en los casos con progresión fue de 16,35 (mínimo: 3,00 y máximo: 57,00) y en los que no progresaron e 7,70 (mínimo: 1,50 y máximo: 34,20).

El PSA libre también aumentaba en los casos con progresión tumoral (1,35 frente a 0,84 en los casos sin progresión), pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p= 0,184$).

Finalmente, el ratio del PSA libre/ total mostró una disminución en los casos con progresión tumoral, aunque de forma no significativa (0,0962 frente al 0,1220 en los casos sin progresión tumoral) ($p= 0,427$).

La tabla 12 resume el análisis de los distintos parámetros clínico-patológicos. Los números en negrita señalan las diferencias significativas ($p < 0,05$) o casi significativas ($p < 0,10$) obtenidas. Se consideraron asociaciones no significativas si p era $>$ o igual a 0,10.

| | GRADO HISTOLÓGICO | PSA total | PSA libre | Ratio PSA | PROGRESIÓN TUMORAL |
|--|--------------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------------|
| ESTADIO | 0,000 | 0,006 | 0,09 | 0,476 | 0,281 |
| MÁRGENES DE RESECCIÓN | 0,066 | 0,082 | 0,111 | 0,741 | 0,655 |
| INVASIÓN DE VESÍCULAS SEMINALES | 0,296 | 0,454 | 0,562 | 0,595 | 0,014 |
| PSA total | 0,04 | --- | --- | --- | 0,040 |
| PSA libre | 0,05 | --- | --- | --- | 0,184 |
| Ratio PSA L/T | 0,526 | --- | --- | --- | 0,427 |
| PROGRESIÓN TUMORAL | 0,006 | 0,040 | 0,184 | 0,427 | --- |

4.3-ESTUDIO DE LA DENSIDAD VASCULAR

Se observaron diferencias tanto en la distribución como en el número de vasos de los distintos patrones morfológicos estudiados.

La densidad vascular era máxima en los adenocarcinomas (mediana de 8,81, rango:9-46), mostrando la mayoría de casos (el 75 %) una media de 11,41 vasos. La densidad vascular fue mayor en las zonas periféricas del tumor con distribución desorganizada con respecto a las estructuras glandulares. Los vasos tumorales presentaban formas aberrantes con frecuentes angulaciones y luces capilares de calibres irregulares (Fig.27).

Así mismo, la densidad vascular era mayor alrededor de las glándulas con lesión de PIN de alto grado (mediana: 5,39, rango: 3-9,67) con respecto a la glándula periférica normal (mediana: 2,95, rango:1,67-4,33). En las zonas de PIN de alto grado y de glándula normal la distribución de los capilares era fundamentalmente periglandular, con vasos de distribución ordenada, tamaños homogéneos y luces regulares (Fig.28,29 y 31).

Las diferencias observadas en los distintos patrones morfológicos fueron estadísticamente muy significativas ($p < 0,001$), evidenciando un claro patrón evolutivo de vascularización en las áreas normal- PIN de alto grado – carcinoma prostático (Gráfica.1).

4.3.1- DENSIDAD VASCULAR Y PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.

4.3.1.1- Densidad vascular y Grado histológico.

Uno de los resultados más interesantes se obtuvo al relacionar el grado de diferenciación de Gleason con la densidad vascular tumoral. El presente estudio demostró mayor densidad vascular en los adenocarcinomas de alto grado con patrón combinado de Gleason 7, 8, 9 y 10 (mediana:9, rango:4,00-15,33) y significativa menor densidad en los adenocarcinomas de bajo grado con patrón combinado de Gleason 4, 5 y 6 (mediana: 7, rango:3,00-12,67) (Figura.30). Por tanto, se demostró una relación directa entre el grado histológico y la densidad vascular ($p = 0,006$).

4.3.1.2 - Densidad vascular y Estadio tumoral.

Se observó que los tumores con estadio pT3 mostraban una mayor densidad de vasos respecto a los adenocarcinomas organoconfinados (pT2). Así, la densidad vascular en los tumores pT3 mostraba una mediana de 9 vasos (rango:3,00-15,33) y en el estadio pT2 de 7 vasos (rango:4,00-12,67), siendo estas diferencias estadísticamente muy significativas ($p=0,009$).

4.3.1.3 - Densidad vascular y Margen de resección .

Los adenocarcinomas con invasión del margen de resección mostraban una mayor densidad vascular (mediana:9, rango:3,00-13,00) respecto a los tumores sin afectación del margen (mediana:8, rango:4,00-15,33), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,592$).

4.3.1.4 - Densidad vascular y Invasión de vesículas seminales.

Respecto a la invasión de las vesículas seminales, los adenocarcinomas con invasión de vesículas mostraron una mayor densidad de vasos (mediana:10, rango:4,00-15,33), respecto a los casos sin invasión (mediana:9, rango:3,00-15,00). Las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,201$).

4.3.1.5 - Relación entre densidad vascular y PSA.

No se evidenció ninguna correlación entre la densidad vascular tumoral y los niveles de PSA total ($p=0,607$), libre ($p=0,834$) y el ratio de PSA libre/ total ($p=0,178$).

4.3.1.6- Densidad vascular y Progresión tumoral.

Se observó un aumento de densidad vascular tumoral en los casos con progresión tumoral. Así, los casos que progresaron tenían una mediana de densidad vascular de 10,00 vasos y los que no progresaron de 8,33; aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,246$).

La Tabla 13 resume el análisis de la densidad vascular frente a los diferentes parámetros clínico-patológicos estudiados. Los números en negrita señalan las diferencias significativas ($p < 0,05$) o casi significativas ($p < 0,10$) obtenidas. Se consideraron asociaciones no significativas si p era $>$ o igual a $0,10$.

| VARIABLE | DENSIDAD VASCULAR |
|---------------------------------|-------------------|
| GRADO HISTOLÓGICO | 0,006 |
| ESTADIO | 0,009 |
| MARGEN DE RESECCIÓN | 0,592 |
| INVASIÓN DE VESÍCULAS SEMINALES | 0,201 |
| PSA total | 0,607 |
| PSA libre | 0,834 |
| Ratio PSA | 0,178 |
| PROGRESIÓN TUMORAL | 0,246 |

4.3.2-DENSIDAD VASCULAR Y EXPRESIÓN DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS VEGF Y bFGF, Y DE LOS RECEPTORES Flt-1 Y FLK/KDR.

La expresión tumoral del receptor FLK/KDR se correlacionó de forma muy significativa con la densidad vascular ($r= 0,353$) ($p=0,007$). Así, los casos con mayor densidad vascular tumoral presentaban también una mayor expresión del receptor angiogénico en la población tumoral (Gráfica 2).

Además , se observó que existía una correlación significativa entre la densidad de vasos tumoral y la expresión vascular de Flt-1 ($r=0,326$ y $p=0,013$) (Gráfica 3).

Por otro lado, se estudió la posible correlación de la densidad vascular en la neoplasia intraepitelial de alto grado y el carcinoma invasor con la expresión de los factores angiogénicos VEGF y bFGF, observándose un aumento no significativo en la expresión de los factores angiogénicos en las lesiones de mayor densidad vascular ($r= 0,165$ y $0,143$, respectivamente) ($p= 0,217$ y $0,283$).

4.4-ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR (Ki67).

4.4.1- ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

El índice de proliferación celular valorado con el Ki67-MIB-1 fue máximo en el adenocarcinoma invasor, observándose en el 75 % de los casos unos valores de Ki67 iguales o inferiores al 10 % (mediana: 5 y rango: 2-30%), (Figura 32).

Además, en las lesiones de PIN de alto grado la proliferación celular era superior a la observada en las glándulas normales (3 % en el PIN de alto grado frente al 0,5 % de la glándula normal) (Figura 33).

Las diferencias observadas en los distintos patrones morfológicos fueron estadísticamente muy significativas ($p=0,000$). (Gráfico 4) (Figura 34 y 35).

Por otro lado, los casos con mayor proliferación celular en el PIN de alto grado mostraban también mayor índice de proliferación en las glándulas normales adyacentes ($r=0,378$ y $p=0,003$).

4.4.2-ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR CON EL RESTO DE PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.

4.4.2.1- PROLIFERACIÓN CELULAR Y GRADO HISTOLÓGICO.

Los adenocarcinomas prostáticos de alto grado mostraron unos índices de proliferación celular valorados con el Ki67 superiores al de los tumores de bajo grado (Ki67 carc.alto grado: 8 %, rango: 2-30 frente a Ki67 carc. bajo grado: 5 %, rango: 2-12). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p= 0,194$).

4.4.2.2- PROLIFERACIÓN CELULAR Y ESTADIO TUMORAL.

El 75 % de los adenocarcinomas prostáticos en estadio pT3 mostraron unos niveles de proliferación celular superiores a los tumores en estadio pT2. Así, en

los tumores pT3 los niveles de proliferación celular fueron iguales o inferiores al 10 % de la población tumoral (mediana: 8 %, rango: 3-30), mientras que en la mayoría de los carcinomas en estadio pT2 la proliferación era inferior al 8,25 % (mediana: 5 %, rango: 2-10). Las diferencias no fueron significativas ($p=0,63$).

4.4.2.3- PROLIFERACIÓN CELULAR Y MÁRGENES DE RESECCIÓN.

No se evidenciaron diferencias significativas en los niveles de proliferación tumoral de los adenocarcinomas prostáticos con o sin afectación de márgenes quirúrgicos ($p=0,380$). Sin embargo, la mediana de proliferación en los tumores con afectación del margen fue ligeramente superior (mediana: 8, rango:3-25) a la observada en los casos sin afectación del mismo (mediana: 5, rango: 2-30).

4.4.2.4 - PROLIFERACIÓN CELULAR Y INVASIÓN DE VESÍCULAS SEMINALES.

El 75 % de los tumores pT3 con invasión de vesículas seminales mostraron un índice de proliferación celular del 18,75 %, mientras que el porcentaje disminuía al 8 % de la población tumoral en los tumores sin invasión de las vesículas seminales, aunque las diferencias no fueron significativas ($p=0,420$).

4.4.2.5- PROLIFERACIÓN CELULAR Y PSA.

Se estudió la posible correlación entre los niveles de PSA total, libre y ratio del PSA y la actividad proliferativa celular tumoral, sin demostrarse ninguna correlación estadísticamente significativa.

4.4.3- ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y DENSIDAD VASCULAR.

Los adenocarcinomas prostáticos con mayor densidad vascular mostraron unos índices de proliferación celular significativamente superiores a aquellos tumores con escasa angiogénesis ($r=0,252$)($p=0,056$) Gráfico 5.

Por otro lado, se demostró una correlación entre los casos con mayor densidad vascular tumoral y una mayor proliferación en el PIN de alto grado del mismo caso ($r=0,254$ y $p=0,054$) Gráfico 6. Finalmente, no se demostró ninguna correlación entre la proliferación celular y la densidad vascular de las glándulas normales ($p= 0,791$).

4.4.4- PROLIFERACIÓN CELULAR Y PROGRESIÓN TUMORAL.

Los adenocarcinomas prostáticos que progresaron tenían unos índices de proliferación celular valorados con el Ki67 ligeramente superiores (mediana:6,00) respecto a los que no progresaron (5,00). Estas diferencias no fueron significativas ($p=0,917$).

La Tabla 14 resume el análisis de la proliferación celular (Ki67) frente a los diferentes parámetros clínico-patológicos estudiados.

| VARIABLE | PROLIFERACIÓN CELULAR (Ki67) |
|-------------------------|-------------------------------------|
| GRADO HISTOLÓGICO | 0,194 |
| ESTADIO TUMORAL | 0,631 |
| MÁRGENES DE RESECCIÓN | 0,766 |
| VESÍCULAS SEMINALES | 0,420 |
| PSA libre/ total/ ratio | 0,545 |
| DENSIDAD VASCULAR TUMOR | 0,056 (Ki67 tumor) |
| DENSIDAD VASCULAR TUMOR | 0,054 (Ki67 PIN) |
| PROGRESIÓN TUMORAL | 0,917 |

4.5-ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.

4.5.1- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN VEGF Y DE SUS RECEPTORES Flt-1 Y FLK/ KDR.

4.5.1.1- EXPRESIÓN DE VEGF.

En todos los adenocarcinomas de próstata valorados en el estudio con diferentes grados de diferenciación, se evidenció una inmunopositividad constante para VEGF (mediana: 160 rango: 100-290). La intensidad de la tinción fue variable en cada caso y en las diferentes zonas del mismo tumor (Figura 36).

La tinción fue citoplasmática y granular con refuerzo en la membrana apical (Fig.37).

Los vasos tumorales mostraron también una intensa expresión de VEGF (mediana: 240, rango: 90-290). En el estroma la inmunoexpresión para VEGF fue de menor intensidad (mediana: 50, rango: 5-240).

La neoplasia intraepitelial de alto grado mostraba una expresión heterogénea de VEGF en el citoplasma del epitelio secretor (mediana: 140, rango: 0-230). Además, la tinción fue más intensa en los vasos periglandulares (mediana: 220, rango: 0-290) (Fig.38,39 y 40).

Por último, las glándulas normales mostraron tan sólo una expresión débil de VEGF en el epitelio secretor y en aisladas células basales (mediana: 90, rango: 0-280). Los vasos que rodeaban a las glándulas normales ofrecían una tinción más intensa que el epitelio glandular (mediana: 145, rango: 5-290). El estroma mostró en estas áreas una leve tinción para VEGF (media: 47,50, rango: 5-210) (Fig.41).

Destacablemente, las diferencias observadas en la inmunoexpresión del factor angiogénico VEGF en el adenocarcinoma, la neoplasia intraepitelial de alto grado y la glándula normal fueron estadísticamente muy significativas ($p=0,000$). En el gráfico 7, observamos que existe una mayor expresión del factor

angiogénico en el HGPIN (mediana:140), con respecto a la glándula normal (mediana:90), siendo máxima en el adenocarcinoma (mediana:160).

Por último, se observó una correlación significativa entre los casos que mostraban mayor expresión de VEGF a nivel tumoral y la expresión del factor angiogénico en la neoplasia intraepitelial de alto grado ($r = 0,310$)($p=0,018$).

4.5.1.2- EXPRESIÓN DE VEGF Y PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.

Se observó una disminución en la expresión de VEGF en los adenocarcinomas de alto grado. Así, la mediana de expresión en los tumores de alto grado fue de 160,00 (rango: 100-270) y de 180,00 en los de bajo grado (rango: 100-290), aunque las diferencias no fueron significativas ($p= 0,673$).

Además, se observó una ligera disminución en la inmunoexpresión del factor angiogénico en la progresión tumoral. Los adenocarcinomas en estadio pT2 mostraban una mediana de expresión de 165,00, y los tumores en estadio pT3 de 160,00 ($p= 0,975$).

Por otro lado, se evidenció una mayor expresión del factor angiogénico VEGF en los tumores sin infiltración del margen (mediana: 170,00) que en los adenocarcinomas con infiltración del margen de resección (mediana: 150,00), aunque las diferencias no fueron significativas ($p= 0,246$).

En cuanto a la invasión de vesículas seminales, se observó un aumento significativo en la expresión de VEGF en los tumores que infiltraban las vesículas seminales (mediana: 220,00) respecto a los tumores sin invasión (mediana: 155,00) ($p= 0,021$).

Por último, se observó una mayor inmunoexpresión de VEGF en el PIN de alto grado y en el tumor en los casos sin progresión tumoral (mediana PIN: 150,00, mediana tumor: 160,00) respecto a los tumores con progresión tumoral (mediana PIN: 115,00, mediana tumor: 150,00). Las diferencias fueron casi significativas en el PIN de alto grado y no significativas en el tumor ($p=0,017$ y $p=0,750$, respectivamente).

4.5.1.3 INMUNOEXPRESIÓN DE VEGF Y PROLIFERACIÓN CELULAR (Ki67).

Se constató que los adenocarcinomas prostáticos con mayor expresión de VEGF mostraban también unos índices de proliferación celular significativamente más elevados ($r= 0,288$) ($p= 0,028$) Gráfico 8.

En la glándula normal también se demostró una correlación entre la expresión del factor angiogénico y la proliferación celular glandular ($r= 0,243$) ($p= 0,066$).

Por último, en el PIN de alto grado no se demostró una correlación entre la inmunexpresión de VEGF y la proliferación celular ($p= 0,372$).

4.5.1.4- EXPRESIÓN DE Flt-1.

La inmunexpresión de este receptor angiogénico fue más intensa en el epitelio de las lesiones de PIN de alto grado y en las células tumorales que a nivel vascular (Figura 42). Se observó una mayor expresión de Flt-1 en el epitelio del PIN de alto grado (mediana: 122,50) respecto a su expresión en células tumorales (mediana: 110) y a la glándula normal (mediana: 30). Las diferencias fueron estadísticamente muy significativas ($p= 0,012$) Gráfica 9 (Figura 43 y 44).

La tinción en los distintos patrones morfológicos fue de distribución citoplasmática y granular (Figura 45).

En los vasos la expresión de Flt-1 fue de menor intensidad respecto al epitelio glandular y a las células tumorales. Aumentaba ligeramente en los vasos que rodeaban a las lesiones de PIN de alto grado (mediana: 10) y en los vasos tumorales (mediana: 17,50) respecto a las glándulas normales (mediana: 2,50).

Finalmente, los casos con mayor expresión del receptor en el PIN mostraban también mayor expresión del receptor en las células tumorales, demostrándose una relación directa y muy significativa entre la expresión de Flt-1 en el epitelio del PIN de alto grado y el adenocarcinoma ($r= 0,478$) ($p= 0,000$) Gráfico 10.

4.5.1.5- EXPRESIÓN DE Flt-1 Y PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.

La expresión de Flt-1 fue mayor en los adenocarcinomas prostáticos de alto grado (mediana: 20,00) y con estadio pT3 (mediana: 22,50) respecto a los adenocarcinomas de bajo grado (mediana:10,00) y a los tumores en estadio pT2 (mediana: 10,00), aunque estas diferencias no fueron significativas ($p=0,770$ y $0,184$, respectivamente).

Por otro lado, los adenocarcinomas con infiltración del margen de resección y que infiltraban las vesículas seminales mostraron un ligero aumento en la expresión vascular de Flt-1 (mediana: 20 y 85, respectivamente) respecto a los tumores sin infiltración del margen y sin invasión de vesículas seminales (mediana: 18 y 15, respectivamente). Las diferencias no fueron significativas ($p=0,223$ y $0,119$).

Por último, no se observaron diferencias significativas en la inmunexpresión tumoral de Flt-1 entre los casos que mostraron progresión tumoral (mediana: 102,00) y los que no progresaron (mediana: 100,00).

4.5.1.6- INMUNOEXPRESIÓN DE FLT-1 Y PROLIFERACIÓN CELULAR.

No se demostró ninguna correlación entre la expresión vascular de Flt-1 en el tumor y en las lesiones de PIN de alto grado, respecto a la proliferación celular valorada con el Ki67-MIB-1 ($p=0,698$ y $0,549$, respectivamente). Tampoco se evidenció correlación entre la expresión del receptor en el epitelio y las células tumorales y la proliferación celular ($p=0,192$ y $0,160$, respectivamente).

4.5.1.7-EXPRESIÓN DE FLK/ KDR.

La mayor inmunoreactividad para el receptor FLK/KDR se observó a nivel de las células tumorales y en el PIN de alto grado. Todos los adenocarcinomas estudiados mostraron una expresión variable del receptor, así como las células endoteliales de los vasos tumorales (mediana tumor: 230, rango:10-300) (mediana vasos tumor: 85, rango:0-240). La inmunotinción fue de distribución citoplasmática y patrón granular (Figura 46 y 47).

En el PIN de alto grado también se observó una significativa mayor expresión de FLK/KDR respecto a las glándulas normales, con tinción positiva de los vasos del estroma interglandular (mediana epitelio PIN: 180, rango: 0-280) (mediana vasos PIN: 40, rango: 0-230) (Figura 48 y 49).

En la glándula normal únicamente se evidenció una tinción leve en células aisladas del epitelio secretor (mediana: 45), destacando sin embargo una constante e intensa expresión de FLK/ KDR de las células basales (Figura 50) .

Las diferencias en la inmunopositividad para FLK/KDR en los distintos patrones morfológicos fueron estadísticamente muy significativas ($p= 0,000$). En el gráfico 11 se observa como la expresión es mayor en el carcinoma (mediana: 230), respecto al PIN de alto grado (mediana: 180), y éste a su vez, muestra mayor expresión que la glándula normal (mediana: 45). Los valores de score de la glándula normal muestran una gran dispersión a causa de la intensa inmunotinción observada en las células basales, constante en todos los casos.

Por último, se demostró una correlación significativa en la expresión del receptor FLK/KDR entre las zonas de tumor y de PIN de alto grado($r = 0,446$). Así, se observó que los casos con mayor expresión del receptor en el tumor ofrecían también una mayor expresión en la zona de PIN de alto grado adyacente ($p=0,000$) Gráfico 12.

4.5.1.8- EXPRESIÓN DE FLK/ KDR Y PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.

La expresión vascular del receptor FLK/ KDR fue mayor en los adenocarcinomas de alto grado y en los tumores en estadio pT3 (mediana: 100,00 y 105,00) respecto a los de bajo grado y estadio pT2 (mediana: 80,00 y 75,00). Aunque estas diferencias no fueron significativas ($p= 0,403$ y $p= 0,145$).

Los tumores con infiltración del margen de resección mostraron mayor expresión vascular de FLK/ KDR (mediana: 130,00) respecto a los tumores sin infiltración (mediana: 75,00), mientras que la expresión vascular de FLK/ KDR fue similar en los tumores con o sin infiltración de vesículas seminales (mediana: 110,00 y 105,00, respectivamente). Las diferencias no fueron significativas ($p= 0,282$).

Finalmente, no se observaron diferencias significativas en la expresión del receptor entre casos con diferente evolución de la enfermedad (mediana en los tumores sin progresión: 230,00 y 227,50 en los que progresaron) ($p=0,399$).

4.5.1.9- INMUNOEXPRESIÓN DE FLK/ KDR Y PROLIFERACIÓN CELULAR.

Se demostró una correlación significativa entre la expresión tumoral del receptor FLK/ KDR y la proliferación celular ($r= 0,262$) ($p= 0,047$). De forma que aquellos casos con mayor inmunoreactividad para FLK/ KDR tuvieron también una mayor proliferación celular, Gráfico 13.

En cuanto a la expresión vascular del receptor, no se demostró ninguna correlación significativa ni en el tumor y ni en el PIN de alto grado con la proliferación de las células tumorales (Ki67-MIB-1) ($p= 0,230$ y $0,709$, respectivamente).

4.5.1.10- ESTUDIO DE LA RELACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE VEGF, Flt-1 Y FLK/ KDR.

Se realizó un estudio estadístico para la correlación de la expresión del factor angiogénico VEGF y de sus receptores en el adenocarcinoma, la neoplasia intraepitelial de alto grado y la glándula normal.

En la neoplasia intraepitelial de alto grado se demostró una correlación significativa entre la expresión epitelial de ambos receptores. Los casos con mayor expresión de Flt-1 mostraban también una mayor expresión de FLK/ KDR ($r= 0,360$) ($p= 0,06$) Gráfica 14.

Por otro lado, los tumores con mayor inmunexpresión de VEGF mostraban una tendencia a aumentar la expresión vascular de ambos receptores Flt-1 y FLK/ KDR, aunque la relación no resultó ser significativa ($p=0,940$ y $0,938$).

Por último, en la glándula normal tampoco se demostró correlación entre la expresión de VEGF y de sus receptores. La expresión vascular de los factores angiogénicos y receptores fue en general más intensa que en el epitelio glandular ($p= 0,256$ y $0,928$).

4.5.2-ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE bFGF.

4.5.2.1- EXPRESIÓN DE bFGF.

El factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) mostró en los distintos patrones morfológicos una expresión poco intensa de distribución citoplasmática y patrón granular. A pesar de tratarse de un factor angiogénico producido principalmente en el estroma la mayor inmunexpresión se observó en el epitelio del PIN de alto grado y en el adenocarcinoma (Figura 51 y 52).

Así, en el estroma prostático la expresión de bFGF fue leve en general, sin observarse diferencias en la inmunexpresión del factor en el estroma que

rodeaba a glándulas normales, glándulas con neoplasia intraepitelial de alto grado o en el estroma tumoral (mediana gl.normal: 10; PIN: 10 y tumoral: 10).

En el epitelio glandular normal la expresión de bFGF fue leve con 48 % de casos negativos (mediana: 5,50) y aumentaba de forma notable y significativa en el epitelio de la neoplasia intraepitelial de alto grado (mediana: 90, rango. 0-190) y el adenocarcinoma (mediana: 90, rango: 0-280) ($p= 0,000$) (Figura 53). Finalmente, los vasos y estroma prostáticos mostraban una tinción leve y heterogénea (Figura 54).

En el gráfico 15 se muestran las diferencias en la inmunexpresión del factor angiogénico bFGF en la glándula normal respecto a la neoplasia intraepitelial y el adenocarcinoma prostático.

4.5.2.2- EXPRESIÓN DE bFGF Y PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.

La expresión de bFGF fue significativamente mayor en los adenocarcinomas de alto grado (mediana: 120,00) respecto a los de bajo grado (mediana: 80,00) ($p=0,024$). Además, la mediana de expresión aumentaba en los tumores en estadio pT3 respecto a los pT2, aunque de forma no significativa (mediana pT2: 90,00 y pT3: 105,00) ($p=0,462$).

En cuanto a la expresión de bFGF en los adenocarcinomas con invasión de los márgenes de resección se observó un ligero aumento en la inmunexpresión del factor (mediana tumores con invasión: 100,00) (mediana tumores sin invasión : 90,00), aunque sin encontrarse significación estadística.

Por otro lado, en los 6 casos con invasión de vesículas seminales la mediana de expresión de bFGF fue superior (mediana: 115,00) a los casos sin invasión (mediana: 85,00), pero las diferencias no fueron significativas ($p=0,655$).

Finalmente, en los casos con progresión tumoral se observó una mayor inmunexpresión del factor angiogénico bFGF. Así, la mediana de expresión del factor en el PIN de alto grado fue de 102,50 y de 95,00 en el tumor en los

casos que progresaron, mientras que la mediana disminuía a 90,00 tanto en el PIN como en el tumor en los que no progresaron ($p=0,432$ y $0,531$).

4.5.2.3- INMUNOEXPRESIÓN DE bFGF Y PROLIFERACIÓN CELULAR.

Aunque en algunos casos se observó un aumento de la expresión de bFGF en tumores con alta proliferación celular no se demostró ninguna correlación significativa ($p= 0,845$). Tampoco se demostró ninguna correlación entre la expresión de bFGF en la glándula normal y el PIN de alto grado con sus niveles de proliferación celular valorados con el Ki67 ($p=0,678$).

4.5.2.4- INMUNOEXPRESIÓN DE bFGF Y DENSIDAD VASCULAR.

Se observó un ligero aumento en la inmunoexpresión tumoral de bFGF en los casos con mayor densidad vascular, aunque dicha correlación no fue estadísticamente significativa ($r=0,143$) ($p=0,283$).

4.5.2.5- ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS VEGF Y bFGF .

Los tumores que mostraban una mayor expresión de VEGF evidenciaban un aumento en la expresión de bFGF, aunque dicha correlación no resultó significativa ($p= 0,275$). Tampoco se observó correlación en la expresión de ambos factores angiogénicos en el PIN de alto grado y la glándula normal ($p= 0,567$ y $0,559$, respectivamente).

Discusión

V. DISCUSIÓN.

5.1- PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.

La mayor parte de las correlaciones clínico-patológicas obtenidas han sido ya corroboradas por estudios anteriores. Así, la media de edad de los pacientes en el momento del diagnóstico fue de 63,66 años, coincidiendo con la franja de edades comprendidas entre los 45 y 89 años en la se presentan el 95% de los cánceres prostáticos (Wingo y col., 1997).

Es destacable la fuerte correlación positiva entre el grado histológico y otros parámetros clínico-patológicos como el estadio y la progresión tumoral. El Sistema de gradación histológica de Gleason es el principal factor predictivo del estadio y pronóstico del cáncer de próstata (Partin y col., 1993). En nuestra serie el 77,4% de casos con alto grado de Gleason mostraban un estadio pT3, y todos los casos con invasión de vesículas seminales se correspondían con adenocarcinomas prostáticos de alto grado. Además, el 76,9% de los casos con infiltración del margen quirúrgico eran tumores de alto grado. En cuanto a la progresión tumoral, 9 de los 10 casos que progresaron eran adenocarcinomas prostáticos de alto grado. Diversos estudios han demostrado que la presencia de un patrón de tipo cuatro o superior de Gleason, o un patrón combinado de Gleason de 7 o superior, es altamente predictivo de mal pronóstico (Stein y col., 1992) (Epstein y col., 1993).

En cuanto a los valores de PSA y las correlaciones obtenidas, nuestro estudio ha evidenciado que los valores de PSA pre-tratamiento eran superiores en el estadio pT3 respecto al pT2. La media de PSA total en el estadio pT3 fue del 14,61 ngr/ml mientras que para el estadio pT2 fue de 8,51 ngr/ml. Numerosos estudios han observado que el PSA se correlaciona con un estadio clínico y patológico avanzado (Partin y col., 1990). En general la mayoría de pacientes (70-80%) con valores de PSA inferiores a 4,0 ngr/ml muestran carcinomas prostáticos organoconfinados, mientras que el 50% de los pacientes con valores de PSA superiores a 10,0 ngr/ml tienen penetración capsular; y la mayoría de los pacientes (75%) con valores de PSA superiores a 50 ngr/ml presentan ya metástasis pélvicas ganglionares (Partin y col., 1990).

En cuanto a la relación observada del PSA con el grado histológico, la heterogeneidad del cáncer prostático dificulta la estimación por los valores de PSA antes del tratamiento. En nuestro estudio se ha observado un incremento de los valores de PSA en los tumores de alto grado. Este hecho podría ser debido a la mayor desestructuración y destrucción tisular observada en los tumores de alto grado que permitiría un acceso más fácil del PSA al torrente circulatorio (Partin y col., 1990).

5.2.DENSIDAD VASCULAR.

La aplicación de diferentes métodos de cuantificación de la densidad vascular ha derivado en la obtención de diferentes resultados según las series, a veces contradictorios. Para Hall y Going (1999) estas diferencias en los resultados en estudios que aparentemente miden el mismo fenómeno biológico son debidas a diferencias metodológicas como pueden ser: un tamaño inadecuado de las muestras, diferencias en el planteamiento del estudio y en la realización del análisis estadístico. Weidner y col. (2000) recomiendan que la medición y valoración de los “*hot spots*” tenga en cuenta la representatividad tumoral del campo escogido para la cuantificación vascular, que la tinción inmunohistoquímica de las estructuras vasculares sea óptima, y que dichos estudios se lleven a cabo por patólogos entrenados y con experiencia suficiente.

La cuantificación de la densidad vascular es un método reproducible, sobretodo después de un adecuado periodo de entrenamiento (Weidner, 1992). Brawer y col. (1994) demostraron una excelente correlación ($r=0,98$, $p<0,001$) entre la cuantificación manual de la densidad vascular y otros sistemas automatizados (p.ej. Optimas Image Analysis).

Finalmente, es importante la elección del anticuerpo utilizado para el marcaje de las células endoteliales. El anticuerpo anti-F8RA/vWF es el más específico para células endoteliales y produce un buen contraste entre los vasos y otros componentes del estroma, pero no tiñe todos los vasos del tejido. En cambio, el CD 31 aunque aparentemente es más sensible nos marca también las células

plasmáticas. En tumores con un gran componente inflamatorio esto puede dificultar la cuantificación de las estructuras vasculares (De Young y col., 1993). El CD 34 es una alternativa aceptable, y es el marcador de células endoteliales que ha demostrado ser más reproducible entre diferentes laboratorios. A pesar de ello, este anticuerpo puede marcar células estromales perivasculares que han de ser cuidadosamente excluidas de la cuantificación (van de Rijn y col., 1994). El Ulex europeus puede marcar también células tumorales, siendo por tanto poco específico.

Por otro lado, se han obtenido resultados interesantes con la utilización de anticuerpos en tejido congelado que detectan las células endoteliales que proliferan o “activadas” (Wang y col., 1993). En un futuro, su optimización en tejidos parafinados aumentará la sensibilidad de la tinción de los vasos tumorales y permitirá la obtención de una mayor correlación con la actividad angiogénica y con la agresividad del tumor.

5.2.1-DENSIDAD VASCULAR EN LA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL DE ALTO GRADO.

Uno de los hallazgos más relevantes de nuestro estudio fue la existencia de un aumento de la densidad vascular alrededor de las glándulas con PIN de alto grado. Montironi y col. (1993) desarrollaron un análisis cuantitativo y cualitativo en profundidad de la arquitectura capilar prostática en la neoplasia intraepitelial prostática (PIN). Su estudio reveló que la lesión de PIN mostraba un mayor número de capilares por glándula y acino con respecto al tejido normal o hiperplásico. De forma similar a las glándulas normales, los capilares que rodean la lesión de PIN mostraban una distribución ordenada, situándose próximos a la membrana basal epitelial.

El PIN de alto grado muestra alteraciones moleculares y cromosómicas, como la pérdida de expresión de p53 (Michardani y col., 1995) (Tamboli y col., 1998) o el incremento en la expresión del oncogén c-erbB-2 (Myers y col., 1994) y bcl-2 (Colombel y col., 1993). La angiogénesis podría ser la consecuencia de factores liberados por la lesión de PIN de alto grado que producirían un

incremento de sustancias estimuladoras de la angiogénesis (VEGF, bFGF, ...) junto a una disminución en la presencia de sustancias inhibitoras (Trombospondina-1,...), capaces de alterar el equilibrio tisular y aumentar de esta forma la angiogénesis periglandular. Las mutaciones en p53 han demostrado disminuir la presencia de la sustancia inhibidora de la angiogénesis Trombospondina-1 en cultivos de fibroblastos de ratón, aumentando de forma importante la vascularización corneal (Dameron y col., 1994). Además, se ha demostrado que se produce una pérdida de inhibición del promotor de VEGF que aumenta su expresión en cultivos celulares (Mukhopadhyay y col., 1995). En el carcinoma de célula pequeña de pulmón y el adenocarcinoma colónico se ha demostrado una asociación significativa entre la mutación de p53, el aumento de VEGF por inmunohistoquímica y el aumento de densidad vascular (Fontanini y col., 1997) (Takahashi y col., 1998).

Por otro lado, en cultivos de cáncer de mama se ha demostrado que el oncogén erbB2/neu/Her2 aumenta la expresión de VEGF a nivel de RNAm y de proteína. Además, el tratamiento con anticuerpos contra dicho oncogén disminuye la expresión de VEGF y la angiogénesis (Vilora-Petit y col., 1997).

Este modelo de progresión angiogénica ha sido válido en otras lesiones pre-neoplásicas como el carcinoma ductal *in situ* de mama y de cérvix uterino que muestran un aumento de la densidad vascular alrededor de las lesiones *in situ* (Weidner y col., 1991) (Smith-McCune y col., 1993). El proceso de angiogénesis se iniciaría en la lesión no invasiva, y aumentaría de forma gradual hasta llegar al carcinoma invasor. En modelos de ratón en los que se ha provocado el desarrollo de adenocarcinomas de páncreas, se ha demostrado un aumento de la densidad y superficie vascular ya en las lesiones preneoplásicas de los ductos pancreáticos (Nagy y col., 2003). Los autores evidencian un aumento de la angiogénesis que favorecería además la progresión tumoral hacia la aparición de metástasis en el adenocarcinoma ya establecido.

En otros modelos tumorales como el carcinoma escamoso de vulva, también se ha demostrado un aumento de la angiogénesis en la neoplasia intraepitelial vulvar (VIN). Este aumento permitió la identificación de aquellas lesiones

displásicas con mayor riesgo de evolucionar a carcinoma invasor (Bamberger y col., 2002).

Hasta el momento, la investigación del papel de la angiogénesis en la carcinogénesis se ha centrado principalmente en el carcinoma ya establecido. En algunos modelos tumorales la densidad vascular ha demostrado ser un factor pronóstico independiente. Actualmente, el estudio de la angiogénesis en las lesiones premalignas esta todavía en fase preliminar, pero estudios clínicos y experimentales apuntan que el uso de la densidad vascular o de la cuantificación de la expresión de factores angiogénicos podrían ser utilizados como marcadores de la capacidad de progresión hacia el carcinoma invasor y del pronóstico y seguimiento de la enfermedad tumoral (Teo y col., 2002).

5.2.2. DENSIDAD VASCULAR EN EL CARCINOMA PROSTÁTICO.

El estudio de la densidad vascular en los tumores, junto con el análisis de la expresión inmunohistoquímica de factores angiogénicos y de sus receptores es un reflejo de la actividad angiogénica de los tejidos. Los primeros estudios sobre la arquitectura vascular en el cáncer de próstata fueron realizados en 1993 por Bigler y col., observando que las áreas de carcinoma mostraban una mayor densidad respecto al tejido normal. También se observaron diferencias cualitativas, con vasos de distribución desorganizada con respecto a las glándulas, de formas aberrantes, con frecuentes angulaciones y luces de calibre irregular.

Posteriormente, Brawer y col. (1994) correlacionaron la densidad vascular con el estadio patológico, demostrando que los casos con mayor densidad de vasos presentaban estadios patológicos más avanzados y una mayor incidencia de invasión capsular. Estos autores propusieron la valoración de la densidad vascular en muestras de core-biopsia, para determinar el pronóstico y como factor predictivo del estadio patológico para la detección de aquellos casos de comportamiento más agresivo.

Por otro lado, Weidner y col. (1993) demostraron que la densidad vascular se relacionaba con el desarrollo de metástasis a distancia, observando que los casos de mayor densidad vascular se correspondían con los casos que desarrollaban metástasis a distancia. Observaron que los carcinomas pobremente diferenciados que producían metástasis mostraban una mayor densidad vascular con respecto a los tumores del mismo grado de Gleason que no metastatizaban. Concluyeron que la indiferenciación tumoral requiere de un concomitante cambio hacia un fenotipo altamente angiogénico para el desarrollo de metástasis.

Nuestro estudio demuestra que la densidad vascular es máxima en las zonas de carcinoma invasor, reflejando así una mayor actividad angiogénica, con el desarrollo de nuevos capilares a partir de vasos pre-existentes.

Existen evidencias indirectas sobre la importancia de la angiogénesis para el desarrollo y crecimiento tumoral. Las células endoteliales de los vasos tumorales proliferan una media de 45 veces más deprisa en el carcinoma de mama respecto al tejido normal y unas 30 veces más deprisa en el carcinoma de próstata, y el grado de crecimiento tumoral está asociado a un incremento de la vascularización tumoral (Vartanian y col., 1994 y 1996). Otras evidencias más directas son que las diferentes drogas utilizadas para la inhibición de la angiogénesis *in vivo*, no han demostrado ser citostáticas para las propias células tumorales *in vitro* (Kim y col., 1993). Por ejemplo, un análogo sintético de la fumagilina (TNP-470) ha demostrado inhibir la proliferación endotelial *in vitro* y el crecimiento tumoral *in vivo* (Ingber y col., 1990). Además, Kim y col., (1993) demostraron que el tratamiento con anticuerpos monoclonales para VEGF en modelos animales inhibía el crecimiento tumoral y la densidad vascular, pero no tenía efecto sobre el crecimiento de las mismas células tumorales *in vitro*.

Finalmente, diversos estudios que han utilizado la sustancia inhibidora angiostatina han aportado importantes evidencias sobre que el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis son procesos angiogénesis dependientes.

La angiostatina inhibe de forma específica la proliferación de las células endoteliales, y en algunos modelos tumorales se ha demostrado que las metástasis permanecían estables, sin crecimiento, manteniéndose por debajo de los 2 mm (O'Reilly y col., 1994). La angiostatina también ha demostrado inhibir de forma significativa el crecimiento tumoral en modelos animales tumorales y en humanos (O'Reilly y col., 2002).

5.2.3. DENSIDAD VASCULAR Y GRADO HISTOLÓGICO.

Existe una gran variabilidad en la densidad vascular de los distintos tumores, e incluso en distintas zonas de un mismo tumor. Nuestro trabajo corrobora los resultados obtenidos por Weidner y col (1993), demostrando que los adenocarcinomas con mayor grado de Gleason (8, 9 y 10), muestran una mayor densidad vascular, en cambio en los adenocarcinomas bien diferenciados con patrón combinado de Gleason 4 y 5 la densidad y distribución vascular son similares a las observadas en zonas de hiperplasia glandular benigna. Este hecho sugiere un cambio hacia un fenotipo altamente angiogénico en fases avanzadas de la enfermedad, correlacionándose con una mayor agresividad de la neoplasia, y una mayor capacidad de desarrollar metástasis a distancia.

Probablemente el incremento de la densidad vascular refleja tan sólo un aspecto de un proceso mucho más complejo que se produce en el estroma del carcinoma, y que lo diferencia del tejido benigno, como sería la presencia de sustancias estimuladoras de la angiogénesis producidas por las propias células tumorales.

5.2.4. DENSIDAD VASCULAR Y ESTADIO TUMORAL.

Más del 50% de cánceres prostáticos clínicamente localizados tratados con prostatectomía radical son infraestadificados utilizando los actuales parámetros clínico-patológicos. Surge así la necesidad de encontrar nuevos marcadores que permitan discriminar aquellos casos de comportamiento más agresivo.

Nuestro estudio ha demostrado una significativa mayor densidad vascular en los adenocarcinomas prostáticos en estadio pT3 respecto a los pT2. Diversos autores han estudiado la angiogénesis tumoral como posible factor predictivo de la agresividad tumoral.

En este sentido son muy interesantes los trabajos de Bostwick y col. (1996) y Rogatsch y col.(1997) que han demostrado que la cuantificación de la densidad vascular en core-biopsias puede ser predictivo de la extensión extracapsular y del estadio patológico del carcinoma en las piezas de prostatectomía. La valoración de la angiogénesis tumoral en core-biopsias podría ser de ayuda al urólogo en el abordaje de la prostatectomía radical.

En otros estudios, el aumento de la densidad vascular tumoral ha sido un factor predictivo del comportamiento agresivo de la neoplasia (Weidner, 2000) y factor pronóstico independiente de la recurrencia en el adenocarcinoma prostático de grado moderado en estadio localizado (Halvorsen y col.2000).

5.2.5. DENSIDAD VASCULAR Y PROGRESIÓN TUMORAL.

El estudio de la densidad vascular como factor pronóstico y predictivo de supervivencia ha sido ampliamente estudiado en diversos modelos tumorales generando resultados a veces contradictorios. En el cáncer de próstata el aumento en la densidad vascular se ha asociado a una mayor frecuencia de metástasis óseas y en general a un mal pronóstico (Weidner, 1993).

En nuestro estudio hemos observado un aumento, aunque no significativo, de la densidad de vasos en los tumores con progresión tumoral.

En este sentido, Rubin y col. (1999) tampoco demostraron una correlación entre la densidad vascular del cáncer prostático y un peor pronóstico. Los autores atribuyen las discrepancias en los resultados entre las diferentes series de la bibliografía a diferencias metodológicas, como son la utilización de distintos anticuerpos o de distintos métodos de cuantificación vascular.

Otros estudios más recientes en cáncer de colon han evidenciado como el aumento en la densidad vascular tumoral se ha correlacionado incluso con una mejor supervivencia (Prall y col., 2003). En este trabajo se menciona como la vascularización previa de un tejido introduce un sesgo invariablemente en la

cuantificación de la neoangiogénesis que depende de cada tejido y de la propia heterogeneidad tumoral.

El aumento de la densidad vascular en un tumor puede aumentar la agresividad tumoral o favorecer la progresión de la enfermedad por diversos mecanismos. En primer lugar, los tumores primarios altamente vascularizados y con gran actividad angiogénica podrán generar a su vez, clonas tumorales metastásicas con gran capacidad angiogénica (Herlyn y col., 1987). En segundo lugar, las células tumorales son capaces de inducir neovascularización en el estroma para su adecuada nutrición. A su vez, se ha demostrado que las células endoteliales de los vasos neoformados sintetizan factores angiogénicos y de crecimiento que actúan de forma paracrina sobre las propias células tumorales, favoreciendo así su crecimiento. En tercer lugar, cuanto mayor es la densidad vascular de un tumor mayores son las posibilidades que las células tumorales sean capaces de entrar en la circulación y puedan generar metástasis a distancia a través de esta ventana vascular (Weidner, 2000).

Seguramente, todos estos factores actúan conjuntamente facilitando el crecimiento tumoral y la aparición de metástasis. Por tanto, es esperable que una mayor densidad vascular se asocie a la agresividad o progresión de la neoplasia. En cambio, existen tumores altamente vascularizados, como el carcinoide bronquial, que raramente metastatizan. Hemos de tener en cuenta que para que una célula metastatize deben tener además, capacidad de proliferación, de penetración en tejidos alejados al tumor primario y de supervivencia al sistema inmunitario, además de otras capacidades que hacen que la angiogénesis sea necesaria pero no suficiente por si sola para que un tumor progrese y produzca metástasis a distancia.

5.2.6.DENSIDAD VASCULAR Y PSA.

Diversos estudios han intentado correlacionar la densidad vascular con el PSA preoperatorio y con la recurrencia del PSA, obteniendo resultados contradictorios.

En nuestra serie no hemos demostrado ninguna correlación significativa entre la densidad vascular tumoral y los valores de PSA preoperatorios. Sin embargo, existía una relación inversa entre la densidad vascular y el PSA; los casos con mayor densidad vascular mostraron una tendencia a disminuir los niveles preoperatorios de PSA total y libre. En este sentido, Abdulkadir y col. (2000) estudiaron la densidad vascular en el cáncer prostático en relación con los niveles preoperatorios de PSA evidenciando que existía una correlación entre la densidad vascular y los niveles de PSA preoperatorios.

Contrariamente, de la Taille y col. (2000) observaron que los casos con mayor densidad vascular mostraban unos niveles más elevados de PSA preoperatorios. Parte de la confusión en los resultados que intentan correlacionar la densidad vascular con el estadio tumoral, el grado histológico y el PSA, se debe a la utilización de distintos anticuerpos para la tinción de las células endoteliales. Los autores compararon en su estudio los resultados obtenidos con la tinción con CD.31 y CD.34, y lo correlacionaron con parámetros clínico-patológicos. Demostraron que pese a considerarse el CD.31 un anticuerpo más específico para las células endoteliales, la tinción vascular con CD.34 es la única que permitió correlacionar la densidad vascular tumoral con la recidiva del PSA post-tratamiento.

Finalmente, en un estudio reciente Papadopoulos y col. (2001) evidenciaron que los casos con mayor densidad vascular tenían una menor inmunexpresión de PSA. Estos resultados sugieren que el PSA tendría un efecto supresor sobre la angiogénesis.

De hecho, ensayos *in vitro* han demostrado que el PSA con su efecto serín proteasa actuaría sobre el Lys-plasminógeno produciendo unos fragmentos biológicamente activos similares a la angiostatina. En ensayos morfogenéticos estos fragmentos han demostrado inhibir la proliferación y capacidad de tubulización de las células endoteliales (Heidtmann y col., 1999).

Esta capacidad inhibidora de la angiogénesis sería de eficacia comparable a la angiostatina. Se postula que el carcinoma invasor se produciría una importante extravasación de plasma con moléculas de plasminógeno que podrían ser convertidas en fragmentos similares a la angiostatina por la acción del PSA.

5.2.7.DENSIDAD VASCULAR , VEGF Y RECEPTORES ANGIOGÉNICOS.

Existen escasas referencias en la literatura que relacionan la densidad vascular con la expresión de factores angiogénicos y de sus receptores. La valoración de la densidad vascular ha sido utilizado en diversos estudios como un método fiable de estimación de la vascularización tumoral. Algunos autores han corroborado estos resultados mediante la comparación con métodos automatizados de análisis de imagen y técnicas de Doppler para la determinación del flujo sanguíneo tumoral. A pesar de ello, aún no se ha consensuado la técnica óptima para una valoración más precisa de la vascularización tumoral (Weidner, 2002).

En el adenocarcinoma de pulmón y en el hepatocarcinoma, la inmunoexpresión de VEGF y de sus receptores se ha asociado a una mayor densidad vascular y al pronóstico (Warren y col., 1995) (Takamani y col., 1997). La pérdida de expresión de VEGF y de Flt-1 se asoció a una mejor supervivencia. Este aumento en la expresión del receptor angiogénico en las células tumorales, podría reflejar una mayor actividad angiogénica en estos casos de mayor densidad vascular. Se potenciaría una estimulación de tipo autocrino sobre el receptor expresado en las células neoplásicas, que a su vez aumentaría la síntesis de sustancias pro-angiogénicas (Carmeliet y col., 2000).

Un estudio con tumores del estroma gastrointestinal (GIST) evidenció una correlación entre densidad vascular y la inmunoexpresión de VEGF. Los tumores que expresaban VEGF mostraban una mayor densidad de vasos y tenían peor pronóstico (Takahashi y col., 2003).

En nuestro estudio no se demostró una correlación entre la expresión de los factores angiogénicos VEGF y bFGF y la densidad vascular. En cambio, se observó que existía una correlación entre la densidad de vasos y la expresión del receptor FLK/KDR en el tumor, así como con la expresión vascular de Flt-1. Además, los receptores Flt-1 y FLK/KDR aumentan su expresión en los tumores con mayor densidad vascular.

La expresión de los receptores angiogénicos en las células endoteliales corrobora una acción paracrina del VEGF a nivel vascular, induciendo cambios en la expresión genética de las células endoteliales y en el proceso de angiogénesis.

La cuantificación de la densidad vascular tumoral es un método que tiene un componente importante de subjetividad que actualmente puede complementarse con otras técnicas más objetivas, como la determinación de factores angiogénicos en sangre y en orina. Watanabe y col.(1992) demostraron mediante técnicas de inmunoensayo que los niveles elevados de bFGF en sangre y en orina de pacientes con cáncer de mama, se asociaban a una mayor angiogénesis y a la aparición de metástasis. Por otro lado, Li y col. (1994) demostraron que el incremento en el líquido cefaloraquídeo de bFGF en pacientes con diferentes tipos de tumores cerebrales, se asociaban a una mayor densidad vascular tumoral y a la recurrencia de la neoplasia.

La determinación de la inmunexpresión de cualquier factor angiogénico (VEGF, bFGF,..) y de sus receptores no tiene porque correlacionarse con la densidad vascular tumoral o la progresión de la enfermedad, ya que como se ha comentado anteriormente, la angiogénesis es el resultado de un balance complejo entre sustancias estimuladoras y inhibitoras que interaccionan en el microambiente tumoral y que pueden no quedar reflejadas en su totalidad en el presente estudio.

5.3- PROLIFERACIÓN CELULAR.

En nuestra serie la media de proliferación celular de los adenocarcinomas valorada con el Ki67-MIB1 fue del 7,43%, con un mínimo de 2% y un máximo del 30%. Por otro lado, observamos unos niveles de proliferación celular significativamente superiores en el adenocarcinoma (7,43%) respecto al PIN de alto grado (3,84%) y a la glándula normal (0,66%).

En la literatura se recogen valores similares que varían según las series, siendo el valor medio de proliferación del 10% que oscilaría entre el 3,2%, el 6,7% (Halvorsen y col., 2001) (Vis y col., 2000) (Cowen y col., 2002). Durante el proceso de transformación maligno el epitelio prostático sufre una serie de anomalías en la diferenciación y proliferación celular.

En el PIN la capa de células basales disminuye la capacidad de proliferación celular, mientras que el epitelio secretor la aumenta, en un fenómeno denominado por algunos autores como “infidelidad topográfica” (Foster y col., 2000). En el PIN menos del 10% de las células proliferantes se encuentran en el compartimento basal; la zona de proliferación se extiende al compartimento de diferenciación en el epitelio secretor prostático. Estas anomalías en la proliferación en el PIN se asocian a la expresión aberrante de oncogenes (erbB-2, erbB-3 y c-met) y de genes supresores tumorales (mm23-H1) (Foster y col., 2000).

5.3.1- PROLIFERACIÓN CELULAR, GRADO HISTOLÓGICO, ESTADIO Y PROGESIÓN TUMORAL.

En la serie de adenocarcinomas de alto grado se observaron unos niveles de proliferación celular superiores a los adenocarcinomas prostáticos de bajo grado (Ki67 alto grado: 8,58% y bajo grado: 6,11%), y los adenocarcinomas en estadio pT3 mostraron unos niveles de proliferación superiores a los pT2 (Ki67 pT3: 8,72% y pT2: 5,85%). Por otro lado, nuestro estudio demuestra un aumento en la proliferación celular en los adenocarcinomas prostáticos con progresión tumoral. De acuerdo con estos resultados Bubendorf y col. (1996) observaron en su estudio a partir de 137 casos de prostatectomías radicales que los índices de proliferación celular eran claramente superiores en los tumores de alto grado y que eran predictivos de progresión tumoral.

Otros trabajos también han demostrado una correlación entre la proliferación celular y el grado de Gleason y el estadio patológico (Bettencourt y col., 1996).

5.3.2- PROLIFERACIÓN CELULAR Y DENSIDAD VASCULAR.

Nuestro trabajo ha demostrado una correlación significativa entre la densidad vascular y la proliferación celular tumoral. Diversos estudios han intentado relacionar la densidad vascular y la proliferación de las células endoteliales o tumorales con resultados contradictorios.

Nuestros resultados son similares a los obtenidos en otro tipo de tumores, como en el cáncer de colon y de mucosa oral, dónde se ha demostrado también una correlación entre la densidad vascular y la proliferación celular tumoral (Típoe y col., 1996) (Vermeulen y col., 1995).

Contrariamente, en el cáncer de próstata, Matsushima y col. (1999) no demostraron una correlación entre la densidad vascular y la proliferación celular de adenocarcinomas prostáticos con y sin tratamiento anti-androgénico. En su estudio evidenciaron una relación inversa entre la densidad de vasos y la apoptosis, que aumentaba drásticamente tras la ablación androgénica.

Por otro lado, un estudio de Weidner y col. (1995) demostró una mayor proliferación endotelial y densidad vascular en el cáncer prostático con respecto al tejido normal. Sin embargo, no se demostró una correlación entre proliferación celular endotelial y la densidad vascular. Los autores sugieren que la angiogénesis y la proliferación celular estarían reguladas por diferentes mecanismos. Estos resultados contradictorios podrían explicarse por que unos estudian la proliferación de las células endoteliales y nosotros la proliferación celular neoplásica, y también a diferencias metodológicas de cuantificación.

5.3.3- PROLIFERACIÓN CELULAR Y EXPRESIÓN DE FACTORES ANGIOGÉNICOS Y DE SUS RECEPTORES.

En nuestra serie los adenocarcinomas prostáticos con mayor expresión de VEGF mostraban también unos índices de proliferación celular valorados con el Ki67-MIB-1 significativamente más elevados. En el carcinoma epidermoide de pulmón también se observó una correlación entre la expresión de VEGF y la proliferación celular neoplásica, sugiriendo que VEGF podría funcionar como un factor autocrino promotor del crecimiento celular (Mattern y col., 1996).

Por otro lado, aunque en nuestro estudio no se demuestra una correlación entre la expresión vascular del receptor FLK/ KDR en el tumor y la proliferación celular, Nakopulou y col. (2002) demostraron en el cáncer de mama, una correlación entre proliferación celular y expresión del receptor FLK/KDR, sugiriendo que VEGF actuaría como factor de crecimiento sobre la población tumoral a través de su receptor FLK/KDR.

5.4- EXPRESIÓN DE FACTORES Y RECEPTORES ANGIOGÉNICOS .

5.4.1- Expresión de VEGF en la neoplasia intraepitelial de alto grado.

Existen pocos estudios que reflejen la angiogénesis en la lesión intraepitelial prostática. En nuestro estudio se demostró un aumento significativo en la inmunexpresión de VEGF en la neoplasia intraepitelial de alto grado respecto al tejido prostático normal.

La primera referencia a la expresión de factores angiogénicos en el PIN la encontramos en un estudio inmunohistoquímico de Harper y col (1998). Sus resultados demostraron una expresión de VEGF variable, con casos débilmente positivos y otros completamente negativos. Estudiaron 60 casos procedentes de RTUs prostáticas, con lesiones de neoplasia intraepitelial prostática de alto y bajo grado , hiperplasia adenomatosa atípica (HAA) y adenocarcinoma coexistente. Tan sólo se observó una intensa inmunotinción para VEGF en las áreas de PIN de alto grado y en el adenocarcinoma.

Posteriormente, Mazzuchelli y col. (2000) en un estudio realizado con 45 casos con adenocarcinoma y PIN de alto grado, diferenciaron dos patrones de inmunexpresión de VEGF en el PIN de alto grado. El patrón A, con inmunotinción de intensidad leve-moderada mostraba una arquitectura capilar similar a la observada en la hiperplasia glandular benigna; y el patrón B, con intensa inmunexpresión de VEGF, mostraba en cambio, una red vascular más desorganizada, similar al adenocarcinoma. En nuestro estudio también se evidenció expresión de VEGF en todos los casos de neoplasia intraepitelial de alto grado con intensidades variables , aunque sin observarse patrones diferenciales de expresión según la arquitectura vascular.

En otros modelos de progresión tumoral como lesiones premalignas de la mucosa bronquial (Lantuejoul y col., 2003), adenomas colónicos con displasia severa (Kondo y col., 2000), y en lesiones de displasia epitelial de la mucosa oral (Brennan y col., 2002), se ha demostrado también un aumento significativo en la inmunexpresión de VEGF respecto al tejido normal, que ha sido correlacionado en algún caso con un aumento de la densidad vascular.

Por último, un estudio reciente sobre la expresión de VEGF en las lesiones de endometriosis que progresaron a carcinoma ovárico demostró un aumento en la expresión de VEGF a nivel de proteína y de ARNm, respecto a las lesiones de endometriosis atípicas que no progresaron a adenocarcinoma (del Carmen y col., 2003).

Estos resultados apoyan la hipótesis que el proceso de angiogénesis pudiera iniciarse en un estadio pre-invasivo, mediante la producción de factores pro-angiogénicos, entre ellos el VEGF, que aumentarían la angiogénesis alrededor de las glándulas con PIN de alto grado.

5.4.2- Expresión de VEGF en el adenocarcinoma prostático.

En el presente estudio, el 100% de los casos de adenocarcinoma prostático mostraron expresión del factor angiogénico VEGF, siendo más intensa en los casos mejor diferenciados (Gleason:4,5 y 6).

El primer estudio sobre la expresión de factores angiogénicos en tumores prostáticos fue llevado a cabo por Harper y col. (1996) . Los autores demostraron una intensa inmunexpresión del factor angiogénico VEGF y de $TGF\alpha$ en secciones histológicas de cáncer prostático y en diversas líneas celulares de cáncer de próstata (PC3, DU-145 y LnCaP).

Casi simultáneamente, Ferrer y col. (1997) demostraron inmunexpresión y distribución tanto *in vivo* como *in vitro* de VEGF en el carcinoma prostático, en relación con el grado de diferenciación del tumor. El análisis *in vitro* de las líneas celulares de carcinoma de próstata (DU-145) reveló bajos niveles de expresión de VEGF que se incrementaban ostensiblemente tras estimulación con IL-1 y TNF, sugiriendo una regulación de la expresión de factores angiogénicos por estas moléculas. Otros estudios de Jackson y col. (1997) corroboraron los anteriores resultados , y detectaron el ARNm de diversas isoformas de VEGF en muestras de tejido prostático benigno y en el adenocarcinoma prostático.

Los autores observaron que la expresión del factor angiogénico disminuía en los tumores más indiferenciados, sugiriendo que la expresión de VEGF disminuiría con la progresión tumoral.

Se ha observado un aumento de la inmunoexpresión de VEGF en otros tumores sólidos, incluyendo la mama (Yoshiji y col., 1996), ovario (Boccock y col., 1995), y carcinomas colo-rectales (Brown y col., 1993), indicando un papel activo de VEGF en el desarrollo y progresión de las neoplasias.

VEGF muestra seis isoformas distintas que se producen por mecanismos de *splicing* alternativo. Algunas de estas isoformas son secretadas al medio mientras que otras permanecen en la célula. Estas isoformas podrían ejercer funciones distintas y desconocidas por el momento según el tipo celular y el microambiente. Los anticuerpos utilizados en los actuales estudios inmunohistoquímicos no permiten diferenciar las isoformas que podrían estar expresándose en diferentes células, y por tanto podrían explicar los resultados contradictorios observados según las series.

Por último, la expresión de VEGF fue constatada también en los vasos y en el estroma. Dicha inmunoexpresión estromal podría ser consecuencia de un secuestro y almacenamiento del factor angiogénico sintetizado por las propias células tumorales. Estudios previos han detectado expresión de VEGF en el estroma del hemangioblastoma (Wizigmann y col., 1995), cáncer de colon (Shiraishi y col., 1995), y de ovario (Boccock y col., 1995). El VEGF secuestrado a nivel estromal podría favorecer la degradación de la matriz extracelular, contribuyendo de esta forma al proceso de angiogénesis.

La intensa expresión de VEGF observada a nivel vascular, se explicaría por la unión del factor angiogénico a sus receptores endoteliales, favoreciendo así la localización del factor que ejercería funciones paracrinas sobre el endotelio vascular. Estudios inmunohistoquímicos han revelado que la expresión proteica de VEGF se localiza en las células tumorales, pero también en el endotelio vascular (Plate y col., 1992). Esta localización nos muestra el VEGF unido a sus receptores endoteliales (Qu y col., 1995).

El bloqueo de VEGF con anticuerpos monoclonales específicos ha demostrado *in vitro* e *in vivo*, una disminución de la angiogénesis tumoral (Kim y col., 1992). En 1993 Kim y col., evidenciaron usando anticuerpos contra VEGF en tres líneas celulares humanas de leiomiocarcinoma, glioblastoma, y rhabdomiocarcinoma, una disminución del crecimiento tumoral de entre un 70 y más del 90 %. En modelos animales de cáncer de próstata tratados con anti-VEGF se ha demostrado una supresión completa del crecimiento tumoral (Borgstrom y col., 1996).

Por otro lado, el uso continuado de anti-VEGF ha llevado a una regresión de los vasos neoformados, sugiriendo que VEGF también es necesario en los vasos maduros para su mantenimiento y supervivencia (Yuan y col., 1996).

5.4.3- Expresión de VEGF y otros parámetros clínico-patológicos.

Nuestro estudio ha demostrado un aumento no significativo en la inmunoexpresión tumoral de VEGF en los tumores órgano confinados (pT2) y en los casos sin infiltración del margen quirúrgico. De igual forma, la mediana de inmunoexpresión de VEGF en el PIN de alto grado y en el adenocarcinoma fue mayor en los tumores que no progresaron que en los casos con progresión tumoral. Contrariamente, los casos con invasión de vesículas seminales mostraron un aumento significativo en la expresión de VEGF.

Latil y col. (2000) demuestran que la sobre-expresión de VEGF se correlaciona con un estadio pT2, y por tanto, sugieren que VEGF sería un marcador pronóstico de tumores en estadio temprano. En cambio, Strohmeyer y col., (2000) demostraron un aumento en la expresión de VEGF en el adenocarcinoma prostático con el grado y el estadio tumoral, observando mayor expresión del factor angiogénico en los pacientes con progresión tumoral.

En otros tumores como el carcinoma colorectal también se han obtenido resultados contradictorios al intentar correlacionar la expresión de VEGF con el pronóstico. Así, en un estudio reciente se correlacionó la expresión de VEGF por los macrófagos tumorales con una mayor supervivencia (Khorana y col.,

2003), mientras que en anteriores estudios no se observó correlación entre la expresión tumoral de VEGF y la supervivencia (Andre y col., 2000), o bien la expresión de VEGF se asociaba a un aumento en la recurrencia del carcinoma colónico en estadio II (Cascinu y col., 2000).

En el cáncer de mama la expresión de VEGF y la densidad microvascular han demostrado ser un indicador pronóstico independiente (Toi y col., 1996). Así, los tumores VEGF positivos mostraron una menor supervivencia (Gasparini y col., 1997). En el carcinoma gástrico los tumores VEGF positivos, mostraron una mayor incidencia de metástasis ganglionares y hepáticas (Maeda y col., 1996).

5.5- INMUNOEXPRESIÓN DE Flt-1 (VEGFR 1).

De acuerdo con estudios anteriores (Weidner, 1993 y 1995) nuestro trabajo ha corroborado una expresión constante de Flt-1 a nivel vascular. Pero destacadamente, se ha observado significativa mayor expresión del receptor en el adenocarcinoma prostático y en la neoplasia intraepitelial de alto grado.

La presencia del receptor en el epitelio podría no ser funcional, pero sugiere funciones autocrinas de VEGF desconocidas sobre la diferenciación y crecimiento de las células epiteliales. Diversos estudios en tejido pancreático y uterino (Rooman y col., 1997)(Brown y col., 1997), han demostrado expresión de Flt-1 y FLK/KDR en epitelio y tejido muscular liso, sugiriendo que en algunos tejidos, el VEGF no sería tan específico para las células endoteliales.

En la literatura existen escasas referencias sobre la expresión de receptores angiogénicos en el cáncer de próstata. Hahn y col. (2000) demuestran también expresión epitelial de Flt-1 en el 56% de los adenocarcinomas estudiados, observando una menor expresión del receptor en el PIN de alto grado y en la glándula normal.

En nuestra serie los tumores mejor diferenciados y en estadios iniciales ofrecen menor expresión del receptor Flt-1, mientras que los tumores con infiltración del margen quirúrgico y de vesículas seminales muestran una mayor inmunoreactividad para el Flt-1.

Por lo tanto, se observa una tendencia a un aumento de la expresión del receptor angiogénico en los carcinomas de alto grado y en la progresión tumoral. En el adenocarcinoma de pulmón el aumento en la expresión de VEGF y de Flt-1 se ha asociado a una menor supervivencia (Takanami y col., 1997). Contrariamente, Hahn y col.(2000), evidenciaron una pérdida de expresión del receptor en los tumores más indiferenciados y en casos con metástasis ganglionares.

En otras neoplasias, como el tumor de Wilms de la infancia también se ha observado inmunoexpresión del receptor Flt-1 en el 47% de los casos, asociándose a un aumento de la densidad vascular y a un peor pronóstico (Ghanem y col., 2003). En el adenocarcinoma de pulmón también se observó un aumento en la expresión de Flt-1 respecto al parénquima pulmonar normal, y además se correlacionó con un aumento en la angiogénesis y una menor supervivencia (Takanami y col., 1997).

En nuestro estudio no observamos diferencias en la expresión de Flt-1 en la progresión tumoral de los casos. Un trabajo reciente en cáncer de endometrio tampoco ha revelado una correlación entre la expresión de Flt-1, la densidad vascular y el pronóstico de la enfermedad (Fine y col., 2000).

Actualmente, se desconoce el grado de implicación que el receptor Flt-1 tiene en la angiogénesis tumoral, ya que los resultados sobre su expresión y distribución en los tejidos son variables y difieren según la neoplasia estudiada. En otros tumores como en el cáncer de ovario (Boccock y col., 1995) no se ha podido demostrar un aumento en la expresión de Flt-1 en el carcinoma, ni por inmunohistoquímica o hibridación in situ, ya que el receptor sólo se expresó a nivel vascular.

En el cáncer de mama tampoco se ha podido demostrar este aumento en la expresión del Flt-1 en el carcinoma respecto al tejido normal (Yoshiji y col., 1996).

Un estudio reciente sobre la expresión de receptores angiogénicos en líneas celulares de cáncer de mama de pacientes con enfermedad localmente avanzada, ha demostrado que la expresión de los receptores Flt-1 y FLK/KDR tendría diferente valor pronóstico. Mientras que el aumento en la expresión de FLK/KDR se asoció a un mal pronóstico, el aumento del receptor Flt-1 se asociaba a una mejor supervivencia (Zhukova y col., 2003).

Se ha demostrado que la forma soluble del receptor Flt-1 tiene *in vivo* capacidad de inhibición del crecimiento tumoral. Esta forma del receptor es capaz de secuestrar a VEGF y de forma heterodímeros inactivos con Flt-1 y FLK/KDR (Kendall y col., 1993) (Goldman y col., 1998). La transfección de un vector con el cDNA de la forma soluble de Flt-1 en tan sólo el 30% de la población tumoral fue capaz de inhibir el crecimiento de neoplasias mediante una disminución de la angiogénesis en modelos animales de ratón (Kong y col., 1998).

5.6- INMUNOEXPRESIÓN DE FLK/KDR (VEGFR 2).

Uno de los resultados más relevante de este estudio fue el aumento de la expresión del receptor angiogénico FLK/KDR en el PIN de alto grado respecto al tejido prostático normal. Existen escasas referencias en la literatura sobre la expresión de receptores angiogénicos en lesiones de neoplasia intraepitelial prostática de alto grado.

Tan sólo Ferrer y col. (1999) estudian la expresión inmunohistoquímica del receptor FLK/KDR en 15 casos con zonas de adenocarcinoma y PIN de alto grado, evidenciando expresión de FLK/KDR en todos sus casos de PIN, tanto a nivel epitelial como vascular.

En nuestro estudio existe además evidencia de una mayor densidad vascular y de expresión de VEGF respecto a la glándula normal, apoyando que el cambio hacia el fenotipo angiogénico se produciría en la lesión pre-neoplásica o PIN de alto grado, acompañando al proceso de carcinogénesis en la evolución hacia el carcinoma invasor.

Por otro lado, demostramos una elevada y constante inmunoexpresión del receptor FLK/KDR en todos los casos de adenocarcinoma prostático, tanto a nivel vascular como en las células neoplásicas. Ferrer y col. (1999) revelaron que la expresión de receptor en el adenocarcinoma era también constante. Los casos mejor diferenciados mantenían la expresión del receptor, pero se evidenciaba una disminución de expresión con la progresión tumoral, siendo negativa en los casos más indiferenciados.

Por el contrario, nosotros observamos que los casos de adenocarcinoma de alto grado de Gleason mostraban una tendencia a una mayor expresión del receptor, sin ser estas diferencias estadísticamente significativas. En los adenocarcinomas en estadio más avanzado (pT3) con afectación del margen quirúrgico también se observó una mayor expresión del FLK/KDR.

La expresión del receptor FLK/KDR no sería exclusivo de las células endoteliales, expresándose también en el epitelio del PIN de alto grado, donde VEGF podría ejercer funciones desconocidas sobre la proliferación celular. VEGF ha demostrado ser un factor de crecimiento para las células del Sarcoma de Kaposi. El bloqueo de VEGF mediante oligonucleótidos antisense inhibió el crecimiento de los fibroblastos en el ratón (Masood y col., 1997). Además, VEGF ha sido capaz de estimular el crecimiento de líneas celulares de melanoma a través de su acción sobre receptores angiogénicos expresados por las propias células tumorales (Liu y col., 1995).

Se ha demostrado que solamente FLK/KDR sería capaz de estimular la mitosis y la quimiotaxis en las células endoteliales. En ratones nulos para la expresión de FLK/ KDR se demostró que Flt-1 no era capaz de inducir la angiogénesis en respuesta a VEGF (Millauer y col., 1994).

Actualmente, se postula que los receptores FLK/KDR y Flt-1 producirían diferentes señales de transducción. FLK/KDR sería de importancia crítica para las diversas funciones angiogénicas de VEGF. La utilización de un inhibidor de tirosín quinasa de los receptores de VEGF, SU 5416, que inactiva FLK/KDR ha demostrado ser eficaz como tratamiento anti-angiogénico en algunos tumores (McMahon, 2000).

5.7- INMUNOEXPRESIÓN DE bFGF.

El factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) se sintetiza en el estroma prostático. Nuestro estudio ha evidenciado que en la glándula normal el bFGF se localiza principalmente en el estroma y los vasos, mientras que no existe prácticamente expresión del factor angiogénico a nivel epitelial. Giri y col. (1999) también observaron que bFGF se expresaba fundamentalmente en el

estroma y vasos interglandulares. En su estudio demostraron un aumento en el ARM m de bFGF en el carcinoma respecto al tejido normal.

Uno de los resultados más destacados ha sido la demostración de un aumento en la inmunexpresión de bFGF en el PIN de alto grado. Recientemente, Huss y col. (2003) han demostrado por RT-PCR en ratones transgénicos (TRAMP) expresión de bFGF en el PIN de alto grado, sugiriendo un inicio temprano del fenotipo angiogénico en el cáncer prostático.

En nuestra serie se observa una tendencia a un aumento en la inmunexpresión de bFGF en los adenocarcinomas de alto grado y con estadios avanzados (pT3), infiltración de márgenes quirúrgicos y de vesículas seminales. En este sentido, anteriores trabajos demostraron un aumento en la expresión de bFGF en carcinomas metastásicos respecto a tumores órgano-confinados y en líneas celulares angrógeno-independientes (Yan y col. .1993). El bFGF aumentaría la síntesis del factor urotelial activador del plasminógeno (uPA) y de diversas colagenasas que estarían implicadas en el proceso de angiogénesis y en la progresión tumoral (Saksela y col., 1987).

El factor de crecimiento fibroblástico básico demostró ser un potente mitógeno en líneas celulares de cáncer prostático (DU-145, PC 3) (Giri y col., 1999).Nuestro estudio no ha podido demostrar una correlación significativa entre la inmunexpresión de bFGF y proliferación celular tumoral. Sin embargo, si hemos podido constatar una tendencia a un aumento en la proliferación celular en los casos con mayor inmunoreactividad para bFGF. En diversas líneas celulares de cáncer prostático (DU 145, LnCaP, PC 3) bFGF ha demostrado inducir un aumento en la cinética y proliferación celular en las células endoteliales y epiteliales prostáticas (Janssen y col. 1995).

Por último, en cuanto a la expresión de bFGF y su relación con la densidad vascular, nuestro trabajo no ha evidenciado una correlación significativa entre la expresión de bFGF y la densidad vascular de los distintos patrones morfológicos. Así, los tumores con más expresión de bFGF mostraban mayor densidad vascular tumoral.

En este sentido, Hepburn y col. (1997) demostraron que la presencia de bFGF en el medio de cultivo estimulaba la proliferación de las células endoteliales de forma dosis-dependiente.

Por otro lado, además del bFGF existen multitud de factores que determinan la densidad vascular de un tumor. Las células del carcinoma prostático producen diversos factores de crecimiento que afectan de forma compleja a la célula endotelial. Así, unos factores estimulan su proliferación, como VEGF, bFGF, y el TGF α , mientras que otros como el TGF β la inhiben.

El fenotipo angiogénico y la densidad vascular como su reflejo, son el resultado del balance entre factores reguladores positivos y negativos secretados por las propias células tumorales (Hepburn y col. 1997).

VEGF y bFGF han demostrado un efecto sinérgico en estudios *in vitro* sobre la proliferación celular endotelial (Pepper y col., 1993). En nuestra serie los tumores con mayor inmunoexpresión de bFGF mostraban un aumento en la expresión de VEGF, aunque de forma no significativa.

Se necesitan más estudios para profundizar en la caracterización de los elementos celulares prostáticos y en los mecanismos que influyen en los procesos moleculares que regulan la angiogénesis y la diferenciación celular, ya que otros factores como el TGF β , EGF, aFGF y PDGF, han demostrado intervenir en la regulación de las interacciones entre el estroma y el epitelio prostático (Peehl y col., 1998).

Conclusiones

VI. CONCLUSIONES.

El estudio de la angiogénesis y de la expresión de proteínas involucradas en el control de la actividad angiogénica en la neoplasia intraepitelial de alto grado y el adenocarcinoma prostático nos ha permitido establecer las siguientes conclusiones:

1.- El estudio de la densidad vascular en las lesiones de PIN de alto grado y el adenocarcinoma invasor demuestra significativa mayor densidad de vasos en el adenocarcinoma respecto a la neoplasia intraepitelial de alto grado ($p < 0,001$), y de la neoplasia intraepitelial de alto grado respecto a la glándula normal ($p < 0,001$).

2.- Existen diferencias significativas en la densidad vascular tumoral y los factores pronósticos independientes: el grado de Gleason ($p = 0,006$) y el estadio patológico ($p = 0,009$), observando una mayor densidad vascular en los grados de Gleason 7,8 y 9, y el estadio localmente avanzado pT3.

3.- En la valoración de la microdensidad vascular tumoral se demuestra una correlación positiva con el índice proliferativo (Ki67) tanto en los adenocarcinomas ($r = 0,252$) ($p = 0,056$) como en las lesiones de PIN de alto grado ($r = 0,254$) ($p = 0,054$).

El método morfométrico de cuantificación empleado mediante la rejilla de Chalkley se confirma como un método idóneo para la valoración de la angiogénesis en este tipo de muestras.

4.- El estudio de la actividad proliferativa con el anticuerpo MIB1 (Ki67) constatan un incremento progresivo del índice proliferativo en el tejido prostático normal, en el PIN de alto grado ($p = 0,000$) y en el adenocarcinoma prostático ($p = 0,000$). Las glándulas normales adyacentes a las áreas de PIN de alto grado con mayor índice de proliferación celular también expresan mayor índice proliferativo ($r = 0,378$) ($p = 0,003$). Estos resultados demuestran una evolución progresiva en la proliferación celular desde glándulas normales próximas al PIN de alto grado hacia el carcinoma invasor.

5.- El estudio de la expresión de los factores angiogénicos VEGF y bFGF demuestra un aumento de su expresión en el adenocarcinoma prostático y en la neoplasia intraepitelial de alto grado respecto al tejido normal ($p=0,000$). Estos resultados sugieren que el proceso de angiogénesis se iniciaría en una fase temprana de la carcinogénesis prostática con la producción de los factores angiogénicos VEGF y bFGF.

6.- En el adenocarcinoma prostático se demuestra una correlación positiva en la expresión de VEGF ($r=0,288$) ($p=0,028$) y de FLK/KDR ($r=0,262$) ($p=0,047$) con la proliferación celular. El factor angiogénico VEGF podría actuar como factor de crecimiento autocrino sobre la población tumoral a través de la expresión del receptor FLK/KDR en las células tumorales.

7.- La expresión de los receptores angiogénicos FLK/ KDR y Flt-1 es significativamente mayor en el adenocarcinoma y el PIN de alto grado que en la glándula normal ($p=0,000$ y $p=0,012$, respectivamente). La mayor expresión de receptores angiogénicos en el epitelio de la neoplasia intraepitelial de alto grado y del adenocarcinoma prostático sugiere funciones autocrinas de VEGF, aún desconocidas sobre la diferenciación y el crecimiento de las células epiteliales.

8.-La densidad vascular tumoral se correlaciona positivamente con la expresión tumoral del receptor FLK/ KDR ($r=0,353$) ($p=0,007$) y con la expresión vascular del receptor Flt-1 ($r=0,326$) ($p=0,013$). El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) podría aumentar la densidad vascular mediante la expresión tumoral y endotelial de los receptores angiogénicos Flt-1 y FLK/ KDR.

9.- La mayor expresión de los factores angiogénicos VEGF y bFGF y de los receptores FLK/ KDR y Flt-1, así como la mayor densidad vascular observada en el adenocarcinoma prostático respecto a la neoplasia intraepitelial de alto grado, y de esta lesión respecto a la glándula normal, apoya la existencia de un patrón evolutivo angiogénico en las diversas etapas del desarrollo tumoral desde la fase inicial premaligna hasta el carcinoma invasor.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

A

Abdulkadir SA, Carvalhal GF, Kaleem Z, Kisiel W, Humphrey PA, Catalona WJ, Milbrandt J. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. *Hum Pathol* 2000;31(4):443-7.

Abrahamsson PA, Wadstrom LB, Alumets J, et al. Peptide-hormone and serotonin-immunoreactive tumor cells in carcinoma of the prostate. *Pathol Res Pract* 1987;182:298.

Adams RH, et al. Roles for ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 1999;13:295-306.

Adlakha K, Bostwick DG. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the prostate. A new histologic variant of prostatic adenocarcinoma. *J Urol Pathol* 1994;2:319.

Aihara M, Wheeler TM, Ohori M et al. Heterogeneity of prostate cancer in radical prostatectomy specimens. *Urology* 1994;43:60-66.

Akagi Y, Liu W, Zebrowski B, Xie K, Ellis LM. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor-I. *Cancer Res* 1998;58:4008-14.

Akagi Y, Liu W, Xie K, Zebrowski B, Shaheen RM, Ellis LM. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by interleukin-1 β . *Br J Cancer* 1999;80:1506-11.

Alers JC, Krijtenberg PJ, Vissers KJ, et al. Interphase cytogenetics of prostatic adenocarcinoma and precursor lesions: analysis of 25 radical prostatectomies in 17 adjacent prostatic intraepithelial neoplasias. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12:241-250.

Algaba F. Evolution of isolated high-grade prostate intraepithelial neoplasia in a mediterranean patient population. *Eur Urol* 1999;35:496-497.

Alline KM, Cohen MB. Signet-ring carcinoma of the prostate. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:99-102.

Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995;1:1024-28.

Amanatullah DF, Reutens AT, Zafonte BT, et al. Cell-cycle dysregulation and the molecular mechanisms of prostate cancer. *Front Biosc* 2000;5:D372-390.

Amin Mb, Ro JY, Ayala AG. Putative precursors lesions of prostatic adenocarcinomas: fact or fiction?. *Mod Pathol* 1993;6:476-83.

Andre T, Kotelevets L, Vaillant JC, et al. VEGF, VEGF-B, VEGF-C, and their receptors KDR, FLT-1 and FLT-4 during the neoplastic progression of human colonic mucosa. *Int J Cancer* 2000;86:174-181.

Andrews GS. Latent carcinoma of the prostate. *J Clin Pathol* 1949;2:197.

Asahara T, Kalka C, Isner JM. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther* 2000;7:451-457.

Azzopardi JG, Evans DJ. Argentaffin cells in prostatic carcinoma: differentiation from lipofuscin and melanin in prostatic epithelium. *J Pathol* 1971;104:247.

B

Bamberger ES, Perrett CW. Angiogenesis in benign, pre-malignant and malignant vulvar lesions. *Anticancer Res* 2002;22:3853-65.

Banai S, Jaktlish MT, Shou M, Lazarous D, Scheinowitz M, Biro S, Epstein S, Unger E. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor. *Circulation Res* 1994;89:2183-89.

Basilico C, and Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res* 1992;59:115-165.

Battegay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, Sage EH, Pech M. PDGF-BB modulates endothelial cell proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *J Cell Biol* 1994;125:917-928.

Ben Av, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts. *FEBS Lett* 1995;372:83-7.

Benedict P, Paciucci R, Thomson TM, et al. PTVO1, a novel protein overexpressed in prostate cancer containing a new class of protein homologues blocks. *Oncogene* 2001;20:1455-1464.

Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode P, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999;103:159-65.

Bennett BD, Richardson PH, Gardner WA. Histopathology and cytology of prostatitis. *Prostate Diseases*. Edited by Lepor and R.K. Lawson, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1993,pp 399-414.

Bergenheim USR, Kunimi K, Collins VP, et al. Deletion mapping of chromosomes 8,10 and 16 in human prostatic carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1991;3:215-220.

Berges RR, Furuya Y, Remington I, et al. Cell proliferation, DNA repair and p53 function are not required for programmed death of prostatic glandular cells induced by androgen ablation. *Proc Nat Acad Sci USA* 1993;90:910-4.

Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Ali IU, Oldfield EH. Expression of vascular permeability factor /vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J Clin Invest* 1993;91:153-9.

Berman DM, Yang J, Epstein JL. Foamy gland high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2000;24:140-144.

Bernal E, Latour J, Pradas F, Gómez LI. The association between vasectomy and prostate cancer: a systematic review of the literature. *Fertil Steril* 1998;70:191-199.

Bernatchez PN, Sokr S, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem* 1999;274:31047-31054.

Berner A, Danielsen HE, Pettersen EO, Fossa SD, Reith A, Nesland JM. DNA distribution in the prostate. Normal gland, benign and pre-malignant lesions and subsequent adenocarcinomas. *Anal Quant Cytol Histol* 1993;15:247-252.

Bettencourt MC, Bauer JJ, Sesterhenn IA, Mostofi FK, McLeod DG. Ki67 expression is a prognostic marker of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Urol* 1996;156(3):1064-8.

Bigler SA, Deering RE, Brawer MK. Comparison of Microscopic Vascularity in Benign and Malignant Prostate Tissue. *Human Pathology* 1993;24:220-226.

Blom JH, Ten Kate FJ, Schroeder H, Van der Heul RO. Morphometrically estimated variation in nuclear size: a useful tool in grading prostatic cancer. *Urol Res* 1990;18:93-99.

Boccock CA, Charnok Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Barker PJ, Wright KA, Twetyman PR, Smith SK. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor flt and KDR in ovarian carcinoma. *JNCI* 1995;87:506.

Bock BJ, Bostwick DG. Does prostatic ductal adenocarcinoma exist?. *Am J Surg Pathol* 1999;23:781-85.

Bonkhoff H, Remberger K. Differentiation pathways and histogenic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *Prostate* 1996;28:98-106.

Bonkhoff H. Role of the basal cells in premalignant changes of the human prostate: A stem cell concept for the development of prostate cancer. *Eur Urol* 1996;30: 201-5.

Bonkhoff H, Fixemer T, Remberger K. Relation between bcl-2, cell proliferation and the androgen receptor status in prostate tissue and precursors of prostate cancer. *Prostate* 1998;34: 251-8.

Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K. Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostatic lesions. *Am J Pathol* 1999;155:641-7.

Bookstein R, Rio P, Madreperla SA, Hong F, Allred C, Grizzle WE, Lee WH. Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;Oct;87(19):7762-6.

Borgstrom P, Hillan KJ, Sriramarao P, Ferrara N. Complete inhibition of angiogenesis and growth in microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatin therapy from intravital videomicroscopy. *Cancer Res* 1996;56:4032-39.

Borràs JM, Galcerán J. Cancer Registry of Tarragona. A: Parkin MD, Muir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J, Powell J, ed. *Cancer incidence in five continents, vol VI*. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Scientific Publication 1992:722-23.

Borre M, Stausbold-Gron B, Overgaard J. p53 accumulation associated with bcl-2, the proliferation marker MIB-1, and survival in patients with prostate cancer subjected to watchful waiting. *J Urol* 2000;164:716-21.

Bostwick DG, Brawer MK. Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer* 1987;59:788-94.

Bostwick DG. Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). *Urology* 1989;34 (Suppl 6):16-22.

Bostwick DG, Amin MB, Dundore P, et al. Architectural patterns of high grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol* 1993;24:298-310.

Bostwick DG, Srigley J, Grignon D, et al. Atypical adenomatous hyperplasia of the prostate: morphologic criteria for its distinction from well-differentiated carcinoma. *Hum Pathol* 1993;24:819-32.

Bostwick DG. Gleason grading of prostatic needle biopsies. Correlation with grade in 316 matched prostatectomies. *Am J Surg Pathol* 1994;18:796-803.

Bostwick DG. High grade prostatic intraepithelial neoplasia: the most likely precursor of prostate cancer. *Cancer* 1995;75: 1.823-36.

Bostwick DG, Qian J. Atypical adenomatous hyperplasia of the prostate. Relationship with carcinoma in 217 whole-mount radical prostatectomies. *Am J Surg Pathol* 1995;19:506-18.

Bostwick DG, Qian J, Frankel K. The incidence of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia in needle biopsies. *J Urol* 1995;155:228-231.

Bostwick DG, Wheeler TM, Blute M, Barrett DM, MacLennan GT, Sebo TJ et al. Optimized microvessel density analysis improves prediction of cancer stage from prostate needle biopsies. *Urology* 1996;48:47-57.

Bostwick DG. Prostatic intraepithelial neoplasia is a risk factor for cancer. *Sem Urol Oncol* 1999;17:187-198

Bostwick DG, Foster CS. Predictive factors in prostate cancer: current concepts from the 1999 College of American Pathologists Conference on Solid Tumors Prognostic Factors and the 1999 World Health Organization Second International Consultation on Prostate Cancer. *Sem Urol Oncol* 1999;17:222-272.

Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond EH et al. Prognostic factors in prostate cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:995-1000.

Bouck N. p53 and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1996;1287:63-6.

Bova GS, Carter BS, Bussemakers MJG, et al. Homozygous deletion and frequent allelic loss on chromosome 8p22 loci in human prostatic cancer. *Cancer Res* 1993;53:3869-73.

Brawer MK, Chetner MP, Beatie J, Buchner DM, Vesella RL, Lange PH. Screening for prostatic carcinoma with prostatic-specific antigen. *J Urol* 1992;147:841-5.

Brawer M, Deering RE, Brown M, Preston SD, Bigler SA. Predictors of Pathologic Stage in Prostatic Carcinoma. The Role of Neovascularity. *Cancer* 1994;73n3:678-687.

Brawn PN. Adenosis of the prostate: a dysplastic lesion that can be confused with prostate adenocarcinoma. *Cancer* 1982;49:826-33.

Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992;114:521-32.

Brennan PA, Palacios-Callender M, Umar T, Tant S, Langdon JD. Expression of type 2 nitric oxide synthase and p21 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31(2):200-5.

Breslow N, Chan CW, Dhom G et al. Latent carcinoma of prostate in autopsy in seven areas. *Int J Cancer* 1977;20:680-688.

Breslow RA, Weed DL. Review of epidemiologic studies of alcohol and prostate cancer: 1971-1966. *Nutr Cancer* 1998;30:1-13.

Brock TA, Dvorak HF, Senger DR. Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca^{2+} and von Willebrand factor release in human endothelium. *Am J Pathol* 1991;138:213-21.

Broders AC. Carcinoma: grading and practical application. *Arch Pathol* 1926;2:376-381.

Brogi E, Schatteman G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keit B, Isner JM. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest* 1996;97:469-76.

Brooks JD, Weinstein M, Lin X, Sun Y, Pin SS, Bova GS, Epstein JI, Isaacs WB, Nelson WG. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:531-536.

Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M, et al. Integrin $\alpha v \beta 3$ antagonist promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994;79:1157-64.

Brooks R, Burrin J, Kohner E. Characterization of release of fibroblast growth factor from bovine retinal endothelial cells in monolayer cultures. *Biochem J* 1991;276:113-120.

Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 1993;143:1255-62.

Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993;53:4727-35.

Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 1995;26:86-91.

Brown LF, Detmar M, Tognazzi K, Abu-Jawdeh G, Iruela-Arispe ML. Uterine smooth muscle cells express functional receptors (flt-1 and KDR) for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 1997;76:245.

Bubendorf L, Sauter G, Moch H et al. Ki67 labelling index : an independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *J Pathol* 1996;178:437-41.

Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P et al. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res* 1999;59:803-806.

Burrus LW, Zuber ME, Lueddecke BA, Olwin BB. Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol* 1992;12:5600-5609.

Bylund A, Zhang JX, Bergh A, Damber JE, Widmark A, Johansson A, et al. Rye brand and soy protein delay growth and increase apoptosis of human LNCaP prostate adenocarcinoma in nude mice. *Prostate* 2000;42:304-14.

C

Calle EE. Do anthropometric measures predict risk of prostate cancer?. *Am J Epidemiol* 2000;151:550-553.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000, vol.407, 249-257.

Carron CP, Meyer DM, Pegg JA, et al. A peptidomimetic antagonist of the integrin $\alpha v \beta 3$ inhibits Leydig cell tumor growth and the development of hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res*, 1998;58:1930-35.

Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of family prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3367-3371.

Carter BS, Steven Bova G, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, Walsh PC. Carcinoma prostático hereditario: características clínicas y epidemiológicas. *J Urol*, ed. Esp. 1994;2:79-85.

Carter HB, Coffey D. The prostate: An increasing medical problem. *Prostate* 1990, 16:39-48.

Cascinu S, Staccioli MP, Gasparini G, et al. Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:2803-2807.

Catalona WJ, Smith DS, Ratcliff TL, et al. Measurement of prostatic-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med* 1991;324:1156-61.

Centifanto YM, Kaufman HE, Zam ZS, Drylie DM, Deardouff SL. Herpes virus particles in prostate carcinoma cells. *J Virol* 1973;12:1608-1611.

Cerhan JR, Torner JC, Lynch CF et al. Association of smoking, body mass, and physical activity with risk of prostate cancer in the Iowa 65+ Rural Health Study (United States). *Cancer Causes Control* 1997;8:229-238.

Chang YS, et al. Abundance of neoplastic cells in vessels walls of human tumor xenograft. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2002.

Chapronicre DM, and McKeehan WL. Serial culture of single adult human prostate epithelial cells in serum-free medium containing low calcium and a new growth factor from bovine brain. *Cancer Res* 1986;46:819-824.

Chen JK, Hoshi H, and McKeehan WL. Heparin-binding growth factor on bone remodeling in vitro. *Clin Invest* 1987;79:52-58.

Cheng L, Shan A, Chevillie JC, Qian J, Bostwick DG. Atypical adenomatous hyperplasia of the prostate: a premalignant lesion ?. *Cancer Res* 1998;58:389-91.

Cheng L, Darson MF, Bergstralh EJ, et al. Correlation of margin status and extraprostatic extension with progression of prostate carcinoma. *Cancer* 1999;86:1775-82.

Cheng L, Pisanky TM, Sebo TJ, et al. Cell proliferation in prostate cancer patients with lymph node metastasis: a marker for progression. *Clin Cancer Res* 1999;5:2820-3.

Cherrington JM, Strawn LM, Shawver LK. New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents. In: Kelin G, vande Woude GF, eds. *Advances in Cancer Research*. Academic Press;2000.1-38.

Chi SG, deVere White RW, Meyers FJ, et al. p53 in prostate cancer: frequent expressed transition mutations. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:926-33.

Claffey KP, Wilkinson WO, Spiegelman BM. Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J Biol Chem* 1992;267:16317-22.

Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delrue F, Weiner RI. The 16 kDaN-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinol* 1993;133:1292-99.

Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YC, Olander JV, Connolly DT, Stern D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990;172:1535-45.

Clegg EJ. The vascular arrangements within the human prostate gland. *Br J Urol* 1956;28:428-435.

Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukine 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996;271:736-41.

Colditz G. Consensus conference: smoking and prostate cancer. *Cancer Causes Control* 1996;7:560-562.

Colombel M, Symmans F, Gil S. Detection of the apoptosis suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone refractory human prostate cancers. *Am J Pathol* 1993;143:390-400.

Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimbruger RM, Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989;84:1470-78.

Coughlin SS, Neaton JD, Sengupta A. Cigarette smoking as a predictor of death from prostate cancer in 348,874 men screened from the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol* 1996;143:1002-1006.

Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, et al. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 1999;13:1382-97.

Cowen D, Troncoso P, Khoo VS, Zagars GK, von Eschenbach AC, Meistrich ML, Pollack A. Ki-67 staining is an independent correlate of biochemical failure in prostate cancer treated with radiotherapy. *Cl Can Res* 2002;8:1148-1154.

Culkin DJ, Wheeler JS, Castelli JRM, Fresco R, Canning JR. Carcinoma of the prostate in a 25-year-old man: a case report and review of the literature. *J Urol* 1986;136:684-85.

Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* 1987;8:338-362.

Cunnigham JM, Shan A, Wick MJ, et al. Allelic imbalance and microsatellite instability in prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1996;56:4475-82.

D

D'Amico AV, Wu Y, Chen MH, Nash M, Renshaw AA, Richie JP. Perineural invasion as a predictor of biochemical outcome following radical prostatectomy for select men with clinically localized prostate cancer. *J Urol* 2001;165:126-29.

Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994;265:1582-84.

Damjanovich L, Turzo C, Adany R. Factors involved in the plasminogen activation system in human breast tumours. *Thromb Haemost* 1994;71(6):684-91.

Davis-Smyth T, Chen H, Park J, Presta LG, Ferrara N. The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *EMBO J* 1996;15:4919-27.

De la Taille A, Katz AE, Bagiella E, Buttyan R, Sharir S, Olsson CA, Burchardt T, Ennis RD, Rubin MA. Microvessel density as a predictor of PSA recurrence after radical prostatectomy. A comparison of CD.34 and CD.31. *Am J Clin Pathol* 2000;113(4):555-62.

De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1999;155:1985-1992.

De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms/like tyrosin kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-91.

De Young BR, Wick MR, Fitzgibbon JF, Sirgi KE, Swanson PE. CD31: an immunospecific marker for endothelial differentiation in human neoplasms. *Appl Immunohistochem* 1993;1:97-100.

Del Carmen MG, Smith Sehdev AE, Fader AN, Zahurak ML, Richardson M, Fruehauf JP, Montz FJ, Bristow RE. Endometriosis-associated ovarian carcinoma: differential expression of vascular endothelial growth factor and estrogen/progesterone receptors. *Cancer* 2003 Oct 15;98(8):1658-63.

Delli Bovi P, Curatola AM, Kern FG, Greco A, Ittman M, Basilico C. An oncogene isolated by transfection of Kaposi's sarcoma DNA encodes a growth factor that is member of the FGF family. *Cell* 1987;50:729-737.

di Sant' Agnese PA. Neuroendocrine differentiation in carcinoma of the prostate. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer* 1992;70(1):254-68.

di Sant' Agnese PA. Neuroendocrine differentiation in clinically localized prostatic carcinoma. *Hum Pathol* 1992;23(3):287-96.

di Sant' Agnese PA. Neuroendocrine differentiation in the precursors of prostate cancer. *Eur Urol* 1996;30(2):185-90.

di Sant' Agnese PA. Divergent neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Sem Diag Pathol* 2000;17:149-161.

Dillner J, Knekt P, Boman J et al. Sero-epidemiological association between human-papillomavirus infection and risk of prostate cancer. *Int J Cancer* 1998;75:564-567.

Doll JA, Zhu X, Furman J, Kaleem Z, Torres C, Humphrey PA, Donis-Keller H. genetic analysis of prostatic atypical adenomatous hyperplasia (adenosis). *Am J Pathol* 1999;155:967-971.

Dow JK, Thompson ID, Chaudhuri G, et al. The gene of basic fibroblastic growth factor, a potent tumor angiogenic inducer, is acquired by the human primary prostate cancer cells with metastatic potential. *J Urol* 1997;157:221.

Drago J, Badalament R, Guill M. Relative value of prostatic specific antigen and prostatic acid phosphatase in diagnosis and management of adenocarcinoma of prostate. *Urology* 1989;43:187-192.

Drake CJ, Cheresch DA, Little CD. An antagonist of integrin $\alpha v\beta 3$ prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization. *J Cell Sci* 1995;108:2655-61.

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-39.

Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LE, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:97-132.

E

Eberhard A, Kahlert S, Goede V, et al. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for anti-angiogenic therapies. *Cancer Res* 2000;60:1388-93.

Eliceiri BP, Cheresch DA. The role of alphav integrins during angiogenesis insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 1999;103:1227-30.

Emmert-Buck MR, Vocke CD, Pozzatti RO, Duray PH, Jennings SB, Florence CD, et al. Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res* 1995;55:2959-62.

Enestein J, Waleh NS, Kramer RH. Basic FGF and TGF- β differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 1992;203:499-503.

Enholm B, Paavonen K, Ristimaki A, et al. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-I mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* 1997;14:2475-83.

Epstein JI, Lieberman PH. Mucinous adenocarcinomas of the prostate gland. *Am J Surg Pathol* 1985;9:299-308.

Epstein JI, Oesterling JE, Walsh PC. The volume and anatomical location of residual tumor in radical prostatectomy specimens removed for stage A1 prostate cancer. *J Urol* 1988;139:975-979.

Epstein JI, Cho KR, Quinn BD. Relationship of severe dysplasia to stage A (incidental) adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1990;65:2321-2327.

Epstein JI, Pizo VG, Walsh PC. Correlation of pathologic findings with progression after radical retropubic prostatectomy. *Cancer* 1993;71:3582-93.

Epstein JI, Partin AW, Sauvageot J, et al. Prediction of progression following radical prostatectomy. *Am J Surg Pathol* 1996;20:286-92.

Etzioni R, Cha R, Feuer EJ, Davidov O. Asymptomatic incidence and duration of prostate cancer. *Am J Epidemiol* 1998;148:775-785.

E

Favard C, Moukadiri H, Dorey C, Praloran V, Plouet J. Purification and biological properties of vasculotropin, a new angiogenic cytokine. *Biol Cell* 1991;73:1-6.

Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-9.

Ferrara N, Houck k, Jakcman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth family of proteins. *Endocri Rev* 1992;13:18-32.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Trends Cardiovasc Med* 1993;3:244-50.

Ferrer FA, Miller RI, Andrawis RI, Kurtzman SH, Albertsen PC, Laudone VP, Kreutzer DL. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human prostate cancer: in situ and in vitro expression of VEGF by human prostate cancer cells. *J Urology* 1997;157:2329-2333.

Ferrer FA, Miller LJ, Lindquist R, Kowalczyck P, Laudone VP, Albertsen PC, Kreutzer DL. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in human prostate cancer. *Urology* 1999;54:567-572.

Fiedler W, Graeven U, Süleyman E, Verago S, Kilic N, Stockscläder M, Hossfeld DK. Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood* 1997;89:1870-75.

Filella X, Molina R, Alcover J, Carretero P, Ballesta AM. Detection of nonprostatic PSA in serum and nonserum samples from women. *Int J Cancer* 1996;68:424-427.

Fine BA, Valente PT, Feinstein GI, Dey T. VEGF, flt-1, and FLK/KDR as a prognostic indicators in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2000;76(1):33-9.

Finklestein SP, Apostolides PJ, Caday CG, Prosser J, Philips MF, Kalgsbrun M. Increased basic fibroblast growth factor (bFGF) immunoreactivity at the site of focal brain wounds. *Brain Res* 1988;460:253-259.

Flanders WD: Review. Prostate cancer epidemiology. *Prostate* 1984;5:621-632.

Flaumenhaft R, Moscatelli D, Saksela O, Rifkin DB. The role of the extracellular matrix in the action of basic fibroblast growth factor: Matrix as a source of growth factor for long-term stimulation of plasminogen activator production and DNA synthesis. *J Cell Physiol* 1989;140:75-81.

Flaumenhaft R, Moscatelli D, Rifkin DB. Heparin and heparan sulfate increase the radius of diffusion and action of bFGF. *J Cell Biol* 1990;111:1651-1659.

Florkiewicz R, Majack R, Buechler R, Florkiewicz E. Quantitative export of FGF2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J Cell Physiol* 1995;162:388-399.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-6.

Folkman J. Angiogenesis: initiation and control. *Ann NY Acad Sci* 1982;40:212-228.

Folkman J, and Klagsburn M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-447.

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosin kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376:66-70.

Fontanini G, Vignati S, Lucchi M, Mussi A, Calcinai A, Boldrini L, Chine S, Silvestri V, Angeletti CA, Basolo F, Bevilacqua G. Neoangiogenesis and p53 protein in lung cancer: Their prognostic role and relation with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *Br J Cancer* 1997;75:1295-1301.

Form DM, Auerbach R. PGEs and angiogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983;172:214-8.

Form DM, Partt BM, Madri JA. Endothelial cell proliferation during angiogenesis: In vitro modulation by basement membrane components. *Lab Invest* 1986;55:521-530.

Foster CS, Cornford P, Forsyth L, Djamgoz MBA, y Ke Y. The cellular and molecular basis of prostate carcinoma. *Br J Urol* 1999; 83: 171-194.

Foster CS, Bostwick DG, Bonkhoff H, Damber JE, van der Kwast T, Montironi R. Cellular and Molecular pathology of the prostate cancer precursors. *Scan J Urol Nephrol Suppl* 2000;205:19-43.

Fowler J, Jr. Whitmore WF. The incidence and extent of pelvic lymph node metastasis in apparently localized prostatic cancer. *Cancer* 1981;47:2941-9.

Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalg DG, Werner S. Regulation of VEGF expression in cultures keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1995;270:12607-13.

Franks L. Atrophy and hyperplasia in the prostate proper. *J Pathol Bacteriol* 1954;68:617-621.

Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresch DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct αv integrins. *Science* 1995;270:1500-02.

G

Gabrilovich DI, Chen HL, Girigs KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:1096-103.

Gaeta JF. Glandular profiles and cellular patterns in prostatic cancer grading. *Urology* 1981, 17 (Suppl.); 33.

Gajdusek CM, Carbon S. Injury-induced release of basic fibroblast growth factor from bovine aortic endothelium. *J Cell Physiol* 1989;139:570-579.

Galland F, karamysheba A, Mattei MG, Rosnet O, Marchetto S, Birnbaum D. Chromosomal location of FLT4, a novel receptor-type tyrosine kinase gene. *Genomics* 1992;13:475-78.

Gasparini G, Toi M, Gion M, Verdeiro P, Didatti R, Hanatani M, Matsubara I, Vinante O, Bomoldi E, Borachi P, Gatti C, Suzuki H, Tominaga T. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:139-47.

Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two VEGF receptor genes, Flt-1 but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997;272:23659-67.

Gettman MT, Pacelli A, Slezak J, Bergstralh EJ, Blute M, Zincke H, Bostwick DG. Role of microvessel density in predicting recurrence in pathologic stage T3 prostatic adenocarcinoma. *Urology* 1999;54(3):479-485.

Ghanem MA, van Steenbrugge GJ, Sudaryo MK, Mathoera RB, Nijman JM, van der Kwast TH. Expression and prognostic relevance of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (Flt-1) in nephroblastoma. *J Clin Pathol* 2003;56(2):107-113.

Giaccia AJ. Hypoxic stress proteins: survival of the fittest. *Semin Radiat Oncol* 1996;6:46-58.

Giovanucci E, Stampfer M, Krithivas K et al. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3320-3323.

Giovanucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Diabetes mellitus and risk of prostate cancer (United States). *Cancer Causes Control* 1998;9:3-9.

Giri D, Ropiquet F, Ittmann M, et al. Alterations in the expression of Basic Fibroblast Growth Factor (FGF)2 and its receptor FGFR-1 in Human Prostate. *Clin Cancer Res* 1999;5:1063-1071.

Glantz GM. Cirrhosis and carcinoma of the prostate gland. *J Urol* 1964;91:291-293.

Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 1966;50:125-128.

Gleason DF, Mellinger GT, VACURG. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974;111:58-64.

Gleason DF. The Veterans Administration Cooperative Urological Research Group: histological grading and clinical staging of prostatic carcinoma. A: Tannenbaum M (ed). *Urological Pathology: the Prostate*. Lea and Febiger, Philadelphia 1977;171-198.

Gleason DF. Atypica hyperplasia, benign hyperplasia, and well-differentiated adenocarcinoma of the prostate. *Am J Surg Pathol* 1985;9(suppl):a53-67.

Glover FE, Coffey DS, Douglas LL et al. The epidemiology of the prostate cancer in Jamaica. *J Urol* 1998;159:1984-1986.

Goede V, Schimdt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest* 1998;78:1385-94.

Goel A, Abou-Ellela A, DeRose PB, et al. The prognostic significance of proliferation in prostate cancer. *J Urol Pathol* 1996;4:213-23.

Gohagan JK, Prorok PC, Kramer BS, Cornett JE. Prostate cancer screening in prostate, lung, colorectal and ovarian cancer screening trial of the National Cancer Institute. *J Urol* 1994;152:1905-9.

Goldman C, Kim J, Wonf W-L, King V, Brock T, Gillespie Y. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by malignant glioma cells. A model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell* 1993;4:121-33

Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G, Soroceanu L, Heike Y, Gillespie GY, Siegal GP, Mao X, Bett AJ, Huckle WR, Thomas KA, Curiel DT. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8795-800.

Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally

indistinguishable from a fragment of thrombospondin. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:6624-28.

Gospodarowicz D. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. J Biol Chem 1975;250:2515-2519.

Gospodarowicz D, Greenburg G, Bialecki H, Zetter BR. Factors involved in the modulation of cell proliferation in vivo and in vitro: The role of fibroblast and epidermal growth factors in the proliferative response of mammalian cells. In Vitro 1978;14:85-118.

Gospodarowicz D, Bialecki H, Greenburg G. Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. J Biol Chem 1978;253:3736-3743.

Graham CH, Rivers J, Kerbel RS, Stankiewicz KS, White WL. Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (<0,76 mm) malignant melanomas. Am J Pathol 1994;145(3):81-8.

Grimbone MAJ, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. J Exp Med 1972;136:261-276.

Grönberg H, Bergh A, Damber JE, Emanuelsson M. Cancer risk in families with hereditary prostate carcinoma. Cancer 2000;89:1315-1321.

Grosskreutz CL, Anand-Apte B, Duplóa C, et al. Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. Microvasc Res 1999;58:128-36.

Grotendorst GR, Seppa HE, Kleinman HK, Martin GR. Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 1981;78:3669-72.

Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K, Barleon B, Marme D. Both v-Ha-ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. J Biol Chem 1995;270:25915-19.

Guadin PB, Sesterhenn IA, Wojno KJ, Mostofii FK, Epstein JI. Incidence and clinical significance of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia in TURP specimens. Urology 1997;49:558-563.

Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. J Natl Cancer Inst 1995;87:1237-45.

Guidi AJ, Abu Jawdeh G, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma. Cancer 1996;78:454-60.

Guo D, Jia Q, Song H-Y, Warren RS, Donner DB. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. J Biol Chem 1995;270:6729-33.

Guo Y, Sigman DB, Borkowski A, Kyprianou N. Racial differences in prostate cancer growth: apoptosis and cell proliferation in Caucasian and African-american patients. Prostate 2000;42:130-136.

H

Hackney AC. The male reproductive system and endurance exercise. *Med Sci Sports Exerc* 1996;28:180-189.

Hahn D, Simak R, Steiner GE, Handisurya A, Susani M, Marberger M. Expression of the VEGF-receptor Flt-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. *J Urol* 2000;164:506-510.

Hall PA, Levison DA. Assessment of cell-proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 1990;43:184-92.

Hall PA, Going JJ,: Review. Predicting the future: A critical appraisal of cancer prognosis studies. *Histopathology* 1999;35:489-494.

Halvorsen OJ, Haukaas S, Hoisaeter A, Akslen LA. Independent prognostic importance of microvessel density in clinically localized prostate cancer. *Anticancer Res* 2000;20(5C):3791-9.

Halvorsen OJ, Haukaas S, Hoisaeter PA, Akslen LA. Maximum Ki-67 staining in prostate cancer provides independent prognosis information after radical prostatectomy. *Anticancer Res* 2001;21(6A):4071-6.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64.

Hankey BF, Feuer EJ, Clegg LX, et al. Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer – Part I: evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality and survival rates. *JNCI* 1999;91:1017-1024.

Harper ME, Glynne-Jones E, Goddard L, Thurston VJ, Griffiths K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostatic tumors and its relationship to neuroendocrine cells. *Br J Cancer* 1996;74:910-116.

Harper ME, Glynne-Jones E, Goddard L, Mathews P, Nicholson RI. Expression of androgen receptor and growth factors in premalignant lesions of the prostate. *J Pathol* 1998;186:169-177.

Harvei S, Kravdal O. The importance of marital and socio-economic status in incidence and survival of prostate cancer. An analysis of complete Norwegian birth cohorts. *Prev Med* 1997;26:623-632.

Hashimoto E, Ogita T, Nakaoka T, Matsuoka R, Takao A, Kira Y. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol* 1994;267:H1948-H1954.

Hashimoto M, Ohsawa M, Ohnishi A, Naka N, Hirota S, Kitamura Y, Aozasa K. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNA in angiosarcoma. *Lab Invest* 1995;73:859-63.

Hashizume H, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 2000;156:1363-80.

Hatva E, Kaipainen A, Mentula P, Jääskeläinen J, Paetau A, Haltia M, Alitalo K. Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors. *Am J Pathol* 1995;146:368-78.

Hayes RB, Morris Brown L, Schoenberg JB, et al. Alcohol use and prostate cancer risk in US blacks and whites. *Am J Epidemiol* 1996;143:692-697.

- Heidtmann HH**, Nettelbeck DM, Mingels A, Jäger R, Welker HG, Kontermann RE. Generation of angiostatin-like fragments from plasminogen by prostate-specific antigen. *Br J Cancer* 1999;81:1269-73.
- Hellström M**, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR- β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 1999;126:3047-55.
- Helmlinger G**, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature Med* 1997;3:177-82.
- Helpap B**. Cell kinetic studies on prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and atypical adenomatous hyperplasia (AAH) of the prostate. *Pathol Res Pract* 1995;191:904-7.
- Hepburn PJ**, Griffiths K, Harper ME. Angiogenic Factors Expressed by Human Prostatic Cell Lines: Effect on Endothelial Cell growth in Vitro. *Prostate* 1997;33:123-132.
- Herlyn M**, Clark WH, Rodeck U, Mancianti ML, Jambrosic J, Koprowski H. Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab Invest* 1987;56:461-67.
- Hirschi KK**, Rohovsky SA, D'Amore PA. PDGF, TGF- β , and heterotypic cell-cell interactions mediated endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol* 1998;141:805-14.
- Hisada M**, Rabkin CS, Strickler HD, Wright WE, Christianson RE, van der Berg BJ. Human papillomavirus antibody and risk of prostate cancer. *JAMA* 2000;283:340-341 (carta).
- Hobbs SK**, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4607-12.
- Hobson B**, Denekamp J. Endothelial cell proliferation in tumors and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer* 1984;49:405-13.
- Holash J**, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999;284:1994-8.
- Holash J**, Wiegman SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999;18:5356-62.
- Holmgren L**, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995;1:149-53
- Homandberg GA**, Williams JE, Grant D, Schumacher B, Eisenstein R. Heparin-binding fragments of fibronectin are potent inhibitors of endothelial cell growth. *Am J Pathol* 1985;120:327-32.
- Houck KA**, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806-14.
- Houck KA**, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992;267:26031-37.

Hsing AW, McLaughlin JK, Hrubee Z, Blot WJ, Fraumeni JF. Tobacco use and prostate cancer: 26-year follow-up of US veterans. *Am J Epidemiol* 1991;133:437-441.

Hsing AW, Tsao L, Devesa SS. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 2000;85:60-67.

Huang X, et al. Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science* 1997;275:547-50.

Humphrey PA, Frazier HA, Vollmer RT, et al. Stratification of pathologic features in radical prostatectomy specimens that are predictive of elevated initial postoperative serum prostate-specific antigen levels. *Cancer* 1993;71:1821-7.

Humphrey PA, Kaleem ZK, Swanson PE, Vollner RT. Pseudohyperplastic prostatic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 1998;22(10):1239-46.

Huss WJ, Barrios RJ, Foster BA, Greenberg NM. Differential expression of specific FGF ligand and receptor isoforms during angiogenesis associated with prostate cancer progression. *Prostate* 2003;54:8-16.

I

Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 1995;270:19761-66.

Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG, Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10595-99.

Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Katsuchi S, Kanamuru T, Brem H, Folkman J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature* 1990;348:555-557.

Ingber D. Extracellular matrix and cell shape: potential control point for inhibition of angiogenesis. *J Cell Biochem* 1991;47:236-241.

Ingles SA, Coetzee GA, Ross RK, et al. Association of prostate cancer with vitamin D receptor haplotypes in African-Americans. *Cancer Res* 1998;58:1620-1623.

Isaacs JT, Lundmo PI, Berges R et al. Androgen regulation of programmed death of normal and malignant prostatic cells. *J Androl* 1992;13:457-64.

Isaacs JT. Molecular markers for prostate cancer metastasis. *Am J Pathol* 1997;150:1511-21.

Izquierdo A, Marcos R, Vilardell L, Viladiu P. La incidència del càncer a Catalunya. *Setzè Congrès de Metges i Biòlegs de Llengua Catalana. Llibre de les Ponències* 2000; 195-202.

J

Jackson MW, Bentel JM, Tilley WD. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *J Urology* 1997;157:2323-2328.

Jake M, Schlessinger J, Dionne CA. Fibroblast growth factor receptor tyrosin kinases: Molecular analysis and signal transduction. *Biochim Acta* 1992;1135:185-199.

Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 1992;89:244-53.

Jakeman LB, Armanini M, Philips HS, Ferrara N. Developmental expression of binding sites and mRNA for vascular endothelial growth factor suggest a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology* 1993;133:848-59.

Janerich DT, Hayden CL, Thompson WD, Selenkas SL, Mettlin C. Epidemiologic evidence of perinatal influence in the etiology of adult cancers. *J Clin Epidemiol* 1989;42:151-157.

Janssen T, Kiss R, Dedecker R, Petein M, Pasteels JL, Schulman C. Influence of Dihydrotestosterone, Epidermal Growth Factor, and Basic Fibroblastic Growth Factor on the Cell Kinetics of the PC3, DU145, and LNCaP Prostatic Cancer Cell Lines: Relationship With DNA Ploidy Level. *Prostate* 1995;27:277-286.

Jewet HJ. The present status of radical prostatectomy for stages A and B prostatic cancer. *Urol Clin North Am* 1975;2:105-124.

Jiang Z, Woda BA, Rock KL, et al. P504S: a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma. *Am J Pathol* 2001;25:1397-404.

Johnson DE, Hogan JM, Ayala AG. Transitional cell carcinoma of the prostate. A clinical morphologic study. *Cancer* 1972;29:287-93.

Johnson DE, Lu J, Chen H, Werner S, Williams LT. The human fibroblast growth factor receptor genes: A Common structural arrangements underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in the third immunoglobulin domain. *Mol Cell Biol* 1991;11:4624-4627.

Johnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Avd Cancer Res* 1993;60:1-41.

K

Kabalin JN, McNeal JE, Price HM, Freiha FS, Stamey TA. Unsuspected adenocarcinoma of the prostate in patients undergoing cystoprostatectomy for other causes: incidence, histology and morphometric observations. *J Urol* 1989;141:1091-1093.

Kaipanen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VM, Fang G-H, Dummont D, Breitman M, Alitalo K. Expression of the fms-like tyrosine kinase FLT-4 gene becomes restricted to the endothelium of lymphatic vessels during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3566-70.

Kallakury BVS, Figge J, Ross JS, et al. Association of p53 immunoreactivity with high Gleason grade in prostatic adenocarcinoma. *Hum Pathol* 1994;25:92-7.

Karayi MK, Neal DE, Markham AF. Current status of linkage studies in hereditary prostate cancer. *BJU International* 2000;86:659-669.

Kasper S, Sheppard PC, Yan Y et al. Development, progression and androgen-dependence of prostate tumors in probasin-large T antigen transgenic mice: a model for prostate cancer. *Lab Invest* 1998;78(6):1-15.

Keetch DW, Humphrey PA, Smith DS, Stahl D, Catalona WJ. Clinical and pathological features of hereditary prostate cancer. *J Urol* 1996;155:1841-1843.

Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10705:10709.

Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000;21:505-15.

Khorana A, Ryan C, Cox C, Eberly S, Sahasrabudhe DM. Vascular endothelial growth factor, CD 68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with stage II and stage III colon carcinoma. *Cancer* 2003;97:960-968.

Kieser A, Weich H, Brandner G, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994;9:963-69.

Kim I, Kim HG, So J-N, Kim JH, Kwak HJ, Koh GY. Angiopoietin-I regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/ Akt signal transduction pathway. *Cir Res* 2000;86:24-29.

Kim KJ, Li B, Houck K, Winer J, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth Factors* 1992;7:53-64.

Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillet N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 1993;362:841-44.

Kipling MD, Wateshouse JAH, et al. Cadmium and prostate carcinoma. *Lancet* 1977;1:730-736.

Koch MO, Foster RS, Bell B, et al. Characterization and predictors of prostate specific antigen progression rates after radical retropubic prostatectomy. *J Urol* 2000;164:749-53.

Koivisto P, Kononen J, Palmberg C et al. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res* 1997;57:314-319.

Kondo S, Asano M, Matsuo K, Ohmori I, Suzuki H. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients. *Biochim Biophys Acta* 1994;1221:211-4.

Kondo Y, Arie S, Furutani M, Isigami S, Mori A, Onodera H, Chiba T, Imamura M. Implication of vascular endothelial growth factor and p53 status for angiogenesis in non-invasive colorectal carcinoma. *Cancer* 2000;Apr 15;88(8):1820-7.

Kong HL, Hecht D, Song W, Kovesdi I, Hackett NR, Yayon A, Crystal RG. Regional suppression of tumor growth by in vivo transfer of a cDNA encoding a secreted form of the extracellular domain of the flt-1 vascular endothelial growth factor receptor. *Hum Gene Ther* 1998;10:823-33.

Kouhara H, Hadari Y, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, Schlessinger J. A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* 1997;89:693-702.

Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, et al. Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of bax, a dominant inhibitor of bcl-2. *Am J Pathol* 1994;145:1323-36.

Krajewski S, Krajewska M. Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of Bcl-x expression. *Cancer Res* 1994;54:5501-7.

- Kremer C**, Breier G, Risau W, Plate KH. Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Res* 1997;57:3852-59.
- Krinsky NI**. Overview of lycopene, carotenoids and disease prevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;218:95-7.
- Ku DD**, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol* 1993;265:H586-H592.
- Kuhadja FP**, Gipson T, Mendelsohn G. Papillary adenocarcinomas of the prostate. *Cancer* 1984;54:1328-32.
- Kuhajda FP**, Mann RB. Adenoid cystic carcinoma of the prostate. A case report with immunoperoxidase staining for prostate-specific acid phosphatase and prostate-specific antigen. *Am J Clin Pathol* 1984;81:257-60.
- Kwak C**, Jin RJ, Lee C, Park MS, Lee SE. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and their relationship with p53 status in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *BJU* 2002;89(3):303-9.
- L**
- Landis SH**, Murray T, Golden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 8-31.
- Lantuejoul S**, Constantin B, Drabkin H, Brambilla C, Roche J, Brambilla E. Expression of VEGF, semaphoring SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumors, and cell lines. *J Pathol* 2003;200(3):336-47.
- Latil A**, Bieche I, Pesche S, Valeri A, Fournier G, Cussenot O, Lidereau R. VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin- 1 overexpression in metastatic forms. *Int J Cancer* 2000;89(2):167-71.
- Lauwers GY**, Schevechuk M, Armenekas N, et al. Carcinosarcoma of the prostate. *Am J Surg Pathol* 1993;17:342-9.
- Lee F**. Transrectal ultrasound: Diagnosis and staging of prostate carcinoma. *Urology* 1989;33:5-18.
- Lee PL**, Johnson DE, Cousens LS, Fried VA, Williams LT. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science* 1989;245:57-60.
- Lee WB**, Isaacs WB, Bova GS, Nelson WG. CG island methylation changes near the GSTP-1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:443-450.
- Lee W-H**, Morton RA, Epstein JI, et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the II-class glutathione-S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1733-7.
- Leibovich BC**, Cheng L, Weaver AL, et al. Outcome prediction with p53 immunostaining in patients with locally advanced prostate cancer. *J Urol* 2000;153:1756-60.
- Lesko SM**, Rosenberg L, Shapiro S. Family history and prostate cancer risk. *Am J Epidemiol* 1996;144:1041-1047.

Lesko SM, Louik C, Vezina R, Rosenberg L, Shapiro S. Vasectomy and prostate cancer. *J Urol* 1999;161:1848-1853.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-9.

Levi AW, Epstein JI. Pseudohyperplastic prostatic adenocarcinoma on needle biopsy and simple prostatectomy. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1039-1046.

Levin AC, Ren M, Huber GK, et al. The effect of androgen, estrogen, and growth factors on the proliferation of cultured fibroblast derived from human fetal and adult prostates. *Endocrinology* 1992;130:2413-2419.

Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endego WO, Zhou F, Lee M. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995;270:308-12.

Li VW, Folkerth RD, Watanabe H, Yu C, Rupnick M, Barnes P, Scott RM, Black PM, Sallan SE, Folkman J. Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumors. *Lancet* 1994;334:82-86.

Liavag I. Atrophy and regeneration in the pathogenesis of prostatic carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1968;73:338-350.

Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 1997;277:242-45.

Liu B, Earl HM, Baban D, Shoaibi M, Fabra A, Kerr DJ, Seymour LW. Melanoma cell lines express VEGF receptor KDR and respond to exogenously added VEGF. *Biochem Biophys Res Comm* 1995;217:721-27.

Liu S, Lee I-M, Linson P, Ajani U, Buring JE, Hennekens CH. A prospective study of physical activity and risk of prostate cancer in US physicians. *Int J Epidemiol* 2000;29:29-35.

López-Beltrán A, Pacelli A, Rothenberg HJ, Sebo TJ, Qian J, Bostwick DG. Atypical adenomatous hyperplasia of the prostate: immunophenotype and DNA ploidy analysis. *Mod Pathol* 1996;9:77.

Lu Q-L, Abel P, Foster CS, Lalani E-M. Bcl-2: role in epithelial cell differentiation and oncogenesis. *Human Pathol* 1996;27:102-110.

Lund Nilse TI, Johnsen R, Vatten LJ. Socio-economic and lifestyle factors associated with the risk of prostate cancer. *Br J Cancer* 2000;82:1358-1363.

Luo D, and Lin Y. Recent advances in the study of pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Chin J Urol* 1991;12:57-59.

Luo J, Zha S, Gage WR, et al. alpha-Methylacyl-Coa Racemase: A New Molecular marker for Prostate Cancer. *Cancer Res* 2002;62:2220-6.

M

MacGrogan D, Levy A, Bostwick DG, et al. Loss of chromosome 8p loci in prostate cancer: mapping by quantitative allelic balance. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;10:151-9.

Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987;1:441-5.

Maciag T, Cerundolo J, Ilsley S, Kelley PR, Forand R. An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: Identification and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:5674-5678.

Maciag T, Hoover GA, Stemerman MB, et al. Serial propagation of human endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 1981;91:420-426.

Macoska JA, Trybus TM, Wojno KJ. 8p22 loss concurrent with 8c gain is associated with poor outcome in prostate cancer. *Urology* 2000;55:776-782.

Madan A, Curtin PT. A 24-base-pair sequence 3' to the human erythropoietin gene contains a hypoxia-responsive transcriptional enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3928-32.

Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuda S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, Sowa M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996;77:858-63.

Maisonpierre PC, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 receptor the disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277:55-60.

Mandriota S, Montesano R, Orci L, et al. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995;270:9709-16.

Mandriota SJ, Menoud PA, Pepper MS. Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1996;271:11500-505.

Marcelli M, Ittman M, Mariani S et al. Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res* 2000;60:944-949.

Marics I, Adelaide J, Raybaud F, Mattei M, Coulier F, Planche J, DeLapeyriere O, Birnbaum D. Characterization of the hst-related FGF-6 gene, a new member of the fibroblast growth factor gene family. *Oncogene* 1989;4:335-340.

Markham CW. Prostatic intraepithelial neoplasia: detection and correlation with invasive cancer in fine-needle biopsy. *Urology* 1989;34:57-61.

Masood R, Cai J, Zheng T. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:979-984.

Massey FJ, Bernstein GS, O'Fallon WM, et al. Vasectomy and health. Results from a large cohort study. *JAMA* 1984;252:1023-1029.

Matsushima H, Goto T, Hosaka Y, Kitamura T, Kawabe K. Correlation between proliferation, apoptosis, and angiogenesis in prostate carcinoma and their relation with androgen ablation. *Cancer* 1999;85(8):1822-1827.

Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessels density and tumor cell proliferation in human epidermoid lung carcinomas. *Br J Cancer* 1996;73(7):931-4.

Maygarden SJ, Novotny DB, Moul JW, Bae VL, Ware JL. Evaluation of cathepsin D and epidermal growth factor receptor in prostate carcinoma. *Mod Pathol* 1994;7:930-936.

Mazzucchelli R, Montironi R, Santinelli A, Lucarini G, Pugnali A, Biagini G. Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Capillary Architecture In High-Grade PIN and Prostate Cancer in Untreated and Androgen-Ablated patients. *Prostate* 2000;45:72-79.

Mc Neal JE, Bostwick DG. Intraductal dysplasia : a premalignant lesion of the prostate. *Human Pathol* 1986;17:64-71.

McClelland RA, Finlay P, Walker KJ, Nicholson D, Robertson JF, Blamey RW, Nicholson RI. Automated quantitation of immunocytochemically localized estrogen receptors in human breast cancer. *Cancer Res* 1990 Jun 15;50(12):3545-50.

McConkey DJ, Green G, Pettaway CA. Apoptosis resistance increases with metastatic potential in cells of the human LNCaP prostate carcinoma line. *Cancer Res* 1996;56:5594-9.

McKeehan WL, Adams PS, and Fast D. Different hormonal requirements for androgen-independent growth of normal and tumor epithelial cells from rat prostate. *In Vitro Cell Develop Biol* 1987;23:147-152.

McMahon G. VEGF Receptor Signaling in Tumor Angiogenesis. *The Oncologist* 2000;5(1):3-10.

McMenamin ME, Soung P, Perera S, et al. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res* 1999;59:4291-6.

McNeal JE. Morphogenesis of prostatic carcinoma. *Cancer* 1965;18:1659-66.

McNeal JE, Kindrachuk RA, Freiha FS, Bostwick DG, Redwine EA, Stamey TA. Patterns of progression in prostate cancer. *The Lancet* 1986, 11:60-63.

McNeal JE, Villers A, Redwine EA, et al. Microcarcinoma in the prostate: its association with duct-acinar dysplasia. *Hum Pathol* 1991;22:644-652.

McNeal JE, Yemoto CEM. Spread of adenocarcinoma within ducts and acini: morphologic and clinical correlations. *Am J Surg Pathol* 1996;20:802-814.

McNeal JE. Prostate. *Histology for Pathologists*, ed 2. Edited by SS Stenberg. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997, pp 997-1017.

Mergia A, Eddy R, Abraham JA, et al. The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;138:644-651.

Mettlin C, Natarajan N, Huben R. Vasectomy and prostate cancer risk. *Am J Epidemiol* 1990;132:1056-1061.

Michardani D, Zheng J, Miller GJ. Heterogeneity in intratumor distribution of p53 mutation in human prostatic cancer. *Am J Pathol* 1995;147:92-101.

Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB. Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of a secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol* 1992;151:81-93.

Millauer B, Witzmann Voos S, Schnurch H, Martínez R, Moller NP, Risau W, Ulrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72:835-46.

Millauer B, Shawver LK, Plate KH, et al. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant negative FLK mutant. *Nature* 1994;367:576-79.

Miller GJ. Prostate cancer among the Chinese: Pathologic, epidemiologic and nutritional considerations. In: Resnick and Thompson IM, eds. *Advanced therapy of prostate disease*. London: BC Decker Inc.2000: 18-27.

Mills PK, Beeson WL, Phillips RL, et al. Cohort study of diet and lifestyle and prostate cancer in Adventist men. *Cancer* 1989;64:598-604.

Mills SE, Fowler JE. Gleason histologic grading of prostatic carcinoma. Correlations between biopsy and prostatectomy specimens. *Cancer* 1986;57:346-9.

Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro. *Lab Invest* 1994;71:374-79.

Miray-López R, Joseph-Silverstein J, Rifkin DB, et al. Identification of pituitary factor responsible for enhancement of plasminogen activator activity in breast tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:7780-7784.

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M et al. Tumor suppressor p53 is regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 1994;9:1799-805.

Mohammadi M, Dikic I, Sorokin A, Burgess WH, Jaye M, Schelssinger J. Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol Cell Biol* 1996;16:977-989.

Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EH. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol* 1993;264:C995-C1002.

Montgomery BT, Nativ O, Blute M, et al. Stage B prostate adenocarcinoma: flow cytometric nuclear DNA ploidy analysis. *Arch Surg* 1990;125:327-31.

Montironi R, Magi Galluzzi C, Diamanti L, Taborro R, Scarpelli M, Pisani E. Prostatic Intra-epithelial Neoplasia: qualitative and quantitative analyses of the blood capillary architecture on thin tissue sections. *Path Res Pract* 1993;189:542-548.

Montironi R, Mazzucchelli R, Marshall JR, Bartels PH. Prostate cancer prevention: review of target populations, pathological biomarkers, and chemopreventive agents. *J Clin Pathol* 1999;52:793-803.

Montironi R, Mazzucchelli R, Algaba F, López-Beltrán A. Morphological identification of the patterns of prostatic intraepithelial neoplasia and their importance. *J Clin Pathol* 2000;53:655-665.

Montironi R, Mazzuchelli R, Algaba F, Bostwick DG, Krongrad A. Prostate-specific antigen as a marker of prostate disease. *Virchows Arch* 2000;436:297-304.

Morishita K, Johnson DE, Williams LT. A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (flt-1) that confers endothelial-specific gene expression. *J Biol Chem* 1995;270:27948-53.

Morote J, de Torres I, Caceres C, Vallejo C, Schwartz S Jr, Reventos J. Prognostic value of immunohistochemical expression of the c-erbB-2 oncoprotein in metastatic prostate cancer. *Int J Cancer* 1999;84(4):421:5.

Morote J, Encabo G, de Torres IM. Use of percent free prostate-specific antigen as a predictor of the pathological features of clinically localized prostate cancer. *Eur Urol* 2000;38(2):225-9.

Morote J, Encabo G, Lopez MA, de Torres IM. The free-to-total serum prostatic specific antigen ratio as a predictor of the pathological features of prostate cancer. *BJU Int* 1999;83(9):1003-6.

Morote J, Lopez M, Encabo G, de Torres IM. Effect of inflammation and benign prostatic enlargement on total and percent free serum prostatic-specific antigen. *BJU* 2000;37(4):537-40.

Morote J, Raventos CX, Encabo G, Lopez M, de Torres IM. Effect of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia on total and percentage free serum prostatic-specific antigen. *Eur Urol* 2000;37(4):456-9.

Morote J, Trilla E, Esquena S, Serrallach F, Abascal J, Muñoz A, Id M'Hammed Y, de Torres IM. The percentage of Free Prostatic-Specific Antigen Is Also Useful in Men with Normal Digital Rectal Examination and Serum Prostatic-Specific Antigen between 10,1 and 20 ng/ml. *Eur Urol* 2002;42(2):333.

Morrison HI, Wilkins K, Semenciw R, Mao Y, Wigle D. Herbicides and cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1866-1874.

Morton MS, Griffith SK. How the food we eat may protect your health. *Diet Cancer* 1998;1-16.

Mostofi FK. Grading of prostatic carcinoma. *Cancer Chemother Rep* 1975;59:111-117.

Moul JW, Bettencourt MC, Sesterhenn IA, et al. Protein expression of p53, bcl-2 and Ki67(MIB-1) as a prognostic biomarkers in patients with surgically treated, clinically localized prostate cancer. *Surgery* 1996;120:159-67.

Moyana TN. Adenosquamous carcinoma of the prostate. *Am J Surg Pathol* 1987;11:403-7.

Muir CS, Nectoux J, Staszewski J. The epidemiology of prostatic cancer: geographical distribution and time trends. *Acta Oncol* 1991;30:133-140.

Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP. Wild-type p53 and v-src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 1995;55:6161-6165.

Murkherjee P, Sotnokof AV, Mangian HJ, Zhou JR, Visek WJ, Clinton SK. Energy intake and prostate tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor expression. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:512-23.

Myers RB, Srivastava S, Oeslschlager DK, Grizzle WE. Expression of p160erb-B3 and p185erb-B2 in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma. *JNCI* 1994;86:1140-45.

Myers RB, Grizzle WE. Biomarker expression in prostatic intraepithelial neoplasia. *Eur Urol* 1996;30:153-66.

N

Nagle RB, Brawer MK, Kettelson J, Clark V. Phenotypic relationships of prostatic intraepithelial neoplasia to invasive prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1991;138:119-128.

Nagy K, Toth S, Palfia Z, Rez G. Angiogenesis is continuous with two peaks during azaserine-induced rat pancreatic adenocarcinoma progression: An electron microscopic morphometrical study. *Oncol Rep* 2003;10(6):1999-2004.

Nakamoto T, Chang C, Li A, et al. Basic fibroblast growth factor in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 1992;52:571-577.

Nakopoulou L, Stefanaki K, Panayotopoulou E, Giannopoulou I, Athanassiadou P, Gakiopoulou H, Louvrou A. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1 in breast carcinomas: correlation with proliferation. *Hum Pathol* 2002;33(9):863-870.

Navone N, Troncoso P, Pisters L, et al. p53 Protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1657-69.

Neto GJ, Humphrey PA. Molecular biologic aspects of human prostatic carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1994;102 (suppl 1):S57-64.

Neufeld G, Mitchell R, Ponte P, et al. Expression of human basic fibroblast growth factor cDNA in baby hamster kidney-derived cells results in autonomous cell growth. *J Cell Biol* 1988;106:1385-1394.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.

Nicosia RF, Nicosia SV, Smith M. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-I promote rat aortic angiogenesis *in vitro*. *Am J Pathol* 1994;145:1023-29.

Nomura AMY, Kolonel L. Prostate cancer: a current prespective. *Am J Epidemiol* 1991;13:200-207.

Nugent MA, Edelman ER. Kinetics of basic fibroblast growth factor binding to its receptor and heparan sulfate proteoglycan: A mechanism for cooperativity. *Biochemistry* 1992;31:8876-8883.

O

O'Dowd DJ, Miller MC, Orozco R, Veltri RW. Analysis of repeated biopsy results within 1 year after a non-cancer diagnosis. *Urology* 2000;55:553-558.

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994;79:315-28.

O'Reilly MS, Holmgren L, Chen K, Folkman J. Suppression of angiogenesis in mice by angiostatin inhibits murine and human tumor growth. 2002.

Oesterling JE, Chan DW, Epstein JL, et al. Prostate specific antigen in the preoperative and postoperative evaluation of localized prostatic cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol* 1988;139:766-72.

Ohori AM, Scardino PT, Lapin SL, et al. The mechanisms and prognostic significance of seminal vesicle involvement by prostate cancer. *Am J Surg Pathol* 1993;17:1252-61.

Olson TA, Moharanj D, Carson LF, Ramakrishnan S. Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res* 1994;54:276-80.

Orteil H. Involutionary changes in prostate and female breast cancer in relation to cancer development. *Can Med Assoc J* 1926;16:237.

P

Pacelli A, Bostwick DG. Clinical significance of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia in transurethral resection specimens. *Urology* 1997;50:355-359.

Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, Alitalo K. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res* 1992;52:5738-43.

Pandali PK, Pilat MJ, Yamazaki K, Naik H, Pienta KJ. The effects of Omega-3 and Omega-6 fatty acids on in vitro prostate cancer growth. *Anticancer Res* 1996;16:815-20.

Papadopoulos I, Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI. Tumor angiogenesis is associated with MUC1 overexpression and loss of prostate-specific antigen expression in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7(6):1533-8.

Park C, Galang C, Johanning P, Maksem J. Follow-up aspiration biopsies for dysplasia of the prostate. *Lab Invest* 1989; 60:70-73.

Park JE, Keller HA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor isoforms (VEGF): differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993;4:1317-26.

Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics 1996. *CA Cancer J Clin* 1996;46:5-27.

Parker SL, Davis KJ, Wingo PA, Ries LA, Heath CW. Cancer statistics by race and ethnicity. *CA Cancer J Clin* 1998;48:31-48.

Partin AW, Carter HB, Chan DW, et al. Prostate specific antigen in the staging of localized prostate cancer: influence of tumor differentiation, tumor volume and benign hyperplasia. *J Urol* 1990; 143: 747-752.

Partin AW, Yoo JK, Carter HB, et al. The use of prostate-specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J Urol* 1993;150: 110-114.

Patan S, Munn LL, Jain RK. Intussusceptive microvascular growth in human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1996;51:260-272.

Patterson C, Perrella MA, Hsieh CM, Yoshizumi M, Lee ME, Haber E. Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1995;270:23111-18.

Peehl DM, Sellers RG. Basic FGF, EGF, and PDGF Modify TGF β -Induction of Smooth Muscle cell Phenotype in Human Prostatic Stromal Cells. *Prostate* 1998;35:125-134.

Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator type 1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:902-8.

Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189:824-831.

Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Endocrinology* 1993;133:848-59.

Perlman EJ, Epstein JI. Blood group antigen expression in dysplasia and adenocarcinoma of the prostate. *Am J Surg Pathol* 1990;14:810-818.

Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994;269:6271-74.

Pertschuk LP, Eisenberg KB, Carter AC, Feldman JG. Immunohistologic localization of oestrogen receptors in breast cancer with monoclonal antibodies. *Cancer* 1985;55:1513-1518.

Peters AJM, Miles BJ, Kubus JJ, et al. The prognostic significance of the nuclear DNA content in localized prostatic adenocarcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 1990;12:359-65.

Peters- Gee JM, Miles BJ, Cerny JC, et al. Prognostic significance of DNA quantification in stage D1 prostatic carcinoma with the use of image analysis. *Cancer* 1992;70:1159-65.

Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggest a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8915-19.

Peto R, Doll R, Buckley JB, Sporn MB. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?. *Nature* 1981;290:201-8.

Pettman B, Labourdette G, Weidel M, Sensenbrenner M. The brain fibroblast growth factor (FGF) is localized in neurons. *Neurosci Lett* 1986;68:175-180.

Phillips GD, Stone AM, Jones BD, Schultz JC, Whitehead RA, Knigton DR. Vascular endothelial growth factor (rhVEGF 165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea in vivo. 1995;8:961-65.

Phillips HS, Armani M, Stavrou D, Ferrara N, Westphal M. Intense focal expression of vascular endothelial growth factor mRNA in human intracranial neoplasms: association with regions of necrosis. *Int J Oncol* 1993;2:913-19.

Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*. *Nature* 1992;359:845-48.

Ploüet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT20 cells. *EMBO J* 1989;8:3801-7.

Ploüet J, Moukadiri HJ. Characterization of the receptors for vasculotropin on bovine adrenal cortex-derived capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 1990;265:22071-75.

Potapova O, Fakhari H, Baird S, Mercola D. Platelet-derived growth factor-B/ v-sis confers a tumorigenic and metastatic phenotype to human T98G glioblastoma cells. *Cancer Res* 1996;56:280-6.

Pour P. Prostatic cancer induced in MRC rats by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine and N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine. *Carcinogenesis* 1983;4:49-55.

Pral F, Gringmuth U, Nizze H, Barten M. Microvessel densities and microvascular architecture in colorectal carcinomas and their liver metastases: significant correlation of high microvessel densities with better survival. *Histopathology* 2003, 42:482-491.

Prats H, kaghad M, Prats AC, et al. High molecular mass forms of basic fibroblastic growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:1836-1840.

Q

Qian JQ, Bostwick DG, Takahashi S, Borell TJ, Herath JF, Lieber MM, et al. Chromosomal anomalies in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 1995;55:5408-14.

Qian J, Bostwick DG. The extent and zonal location of prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia: relationship with carcinoma in radical prostatectomy specimens. *Path Res Pract* 1995;191:860-867.

Qian J, Jenkins RB, Bostwick DG. Potential markers of aggressiveness in prostatic intraepithelial neoplasia detected by fluorescence in situ hybridization. *Eur Urol* 1996;30:177-184.

Qu H, Nagy JA, Senger DR, Dvorak HF, Dvorak AM. Ultrastructural localization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor VEGF/VPF to the albuminal plasma membrane and vesiculovacuolar organelles of tumor microvascular endothelium. *J Histochem Cytochem* 1995;43:381-9.

Quinn BD, Cho KR, Epstein JI. Relationship of severe dysplasia to stage B adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1990;65:2328-2337.

Quinn DJ, Henshall SM, Head DR, et al. Prognostic significance of p53 nuclear accumulation in localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. *Cancer Res* 2000;60:1585-94.

Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7533-37.

R

Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streiman JS, Buttyan R. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis *in vitro* and confers resistance to androgen depletion *in vivo*. *Cancer Res* 1995;55:4438-45.

Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 2000;105:17-19.

Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marme D, Kerbel RS. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1995;14:263-277.

Rak J, Mitsushashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995;55:4575-80.

Randolph TL, Amin MB, Ro JY, et al. Histologic variants of adenocarcinoma and other carcinomas of the prostate: pathologic criteria and clinical significance. *Mod Pathol* 1997;10:612-29.

Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 1989;56:154-55.

Ravery V, Boccon-Givod LA, Meudemans A, Dauge-Geffroy MC, Toubanc M, Boccon-Gibod L. Predictive value of pathologic features for progression after radical prostatectomy. *Eur Urol* 1994;148:331-7.

Regueiro JC, Moreno P, Leva M et al. Incidencia de la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado en la práctica urológica. *Actas Urol Esp* 2000;24:446-451.

Reyes AO, Swanson PE, Carbone JM, Humphrey PA. Unusual histologic types of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 1997;21:1215-22.

Ribatti D, Vacca A, Palma W, Lospalluti M, Dammacco F. Angiogenesis during tumor progression in human malignant melanoma. *EXS* 1992;61:415-20.

Ro JY, Tetu B, Ayala AG, et al. Small cell carcinoma of the prostate. Immunohistochemical and electron microscopic studies of 18 cases. *Cancer* 1987;59:977-82.

Ro JY, El-Naggar A, Ayala AG, et al. Signet-ring cell carcinoma of the prostate. Electron-microscopic and immunohistochemical studies of 8 cases. *Am J Surg Pathol* 1988;12:453-60.

Robbins AS, Whittemore AS, Thom DH. Differences in socioeconomic status and survival among white and black men with prostate cancer. *Am J Epidemiol* 2000;151:409-416.

Robinette MA, Robson CJ, Farrow GA, et al. Giant serial step sections of the prostate in assessment of the accuracy of clinical staging in patients with localized prostatic carcinoma (abstract). *J Urol* 1984;133(supl):242^a.

Rodríguez C, Tatham LM, Thun MJ, Calle EE, Heath CW. Smoking and fatal prostate cancer in a large cohort of adult men. *Am J Epidemiol* 1997;145:466-475.

Rogatsch H, Hittmair A, Reissigl A, Mikuz G and Feichtinger H. Microvessel density in core biopsies of prostatic adenocarcinoma: a stage predictor?. *J Pathol* 1997;182:205-210.

Roghani M, Moscatelli D. Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms. *J Biol Chem* 1992;267:22156-22162.

Roghani M, Mansukhani A, Dell'Era P, Bellosta P, Basilico C, Rifkin DB, Moscatelli D. Heparin increases the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor but is not required for binding. *J Biol Chem* 1994;269:3976-3984.

Rohan TE, Howe GR, Burch JD, Jain M. Dietary factors and risk of prostate cancer: a case-control study in Ontario, Canada. *Cancer Causes Control* 1995;6:145-54.

Rooman I, Schiut F, Bouwens L. Effect of vascular endothelial growth factor and differentiation of pancreatic ductal epithelium. *Lab Invest* 1997;76:225.

Rosen EM, Fan S, Golberg ID. BRAC1 and prostate cancer. *Cancer Invest* 2001;19(4):396-412.

Rosenberg L, Palmer JR, Zauber AG, Warshauer ME, Stolley PD, Shapiro S. Vasectomy and the risk of prostate cancer. *Am J Epidemiol* 1990;132:1051-1055.

Ross JS, Nazeer T, Church K, et al. Contribution of HER-2/neu oncogene expression to tumor grade and DNA content analysis in the prediction of prostatic carcinoma metastasis. *Cancer* 1993;72:3020-8.

Ross JS, Figge H, Bui HX, et al. Prediction of pathologic stage and post prostatectomy disease recurrence by DNA ploidy analysis of initial needle biopsy specimens of prostate cancer. *Cancer* 1994;74:2811-8.

Ross JS, Kallakury BVS, Figge J. Pathology and molecular biology of prostate cancer. In: Rifkin MD, ed. *Image of the prostate*. New York: Lippincott Raven, 1997:179-90.

Ross JS, Sheehan CE, Dolen EM, Kallakury V.S. Morphologic and molecular prognostic markers in prostate cancer. (rev.art.) *Adv Anat Pathol* 2002;9,2:115-128.

Ross W, Hall PA. Ki67 from the antibody to molecule to understanding?. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1995;48:M113-7.

Rubin MA, Buyyounouski M, Bagiella E, Sharir S, Neugut A, Benson M, de la Taille A, Katz AE, Olsson CA, Ennis RD. Microvessel density in prostate cancer: lack of correlation with tumor grade, pathologic stage, and clinical outcome. *Urology* 1999;53(3):542-547.

Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, et al. alpha-Methylacyl CoA racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *Jama* 2002;287:1662-70.

S

Saito R, Davis BK, Ollapally EP. Adenosquamous carcinoma of the prostate. *Hum Pathol* 1984;15:87-9.

Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE, Crissman JD. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol* 1993, 150:379-385.

Sakr WA, Sakar FH, Srrepathi P, Drozdowicz S, Crissman JD. Measurement of cellular proliferation in human prostate by AgNOR, PCNA and SPF. *Prostate* 1993;22:147-154.

Sakr WA, Billis A, Ekman P, Wilt T, Bostwick DG. Epidemiology of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2000;205:11-18.

Saksela O, Moscatelli D, and Rifkin DB. The opposing effects of basic fibroblast growth factor and TFG β on the regulation of PA activity in capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 1987;105:957-963.

Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB. Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol* 1988;107:743-751.

Sato N, Beitz JG, Kato J, et al. Platelet-derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis *in vitro*. *Am J Pathol*, 1993;142:1119-30.

Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, et al. Distinct roles of the receptor tyrosin kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessels formation. *Nature* 1995;376:70-4.

Sato Y, Rifkin DB. Autocrine activities of basic fibroblastic growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *J Cell Biol* 1988;107:1199-1205.

Scalzo DA, Kallakury BVS, Gaddipati RV, et al. Cell proliferation rate by MIB-1 immunohistochemistry predicts post radiation recurrence of prostatic adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 1998;109:163-8.

Schulman CC, Zlotta AR, Denis L, Schöder FH, Sakr WA. Prevention of Prostate Cancer. *Scan J Urol Nephrol Suppl* 2000; 205:50-61.

Schulter C, Duchrow M, Wohlenberg C, et al. The cell proliferation associated antigen of antibody Ki67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle maintaining protein. *J Cell Biol* 1993;123:513-22.

Schuurman AG, van der Brandt PA, Dorant E, Brants HA, Goldbohm RA. Association of energy and fat intake with prostate carcinoma risk: results from the Netherlands Cohort Study. *Cancer* 1998;86:1019-27.

Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of ADN encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Nat Acad Sci* 1992;89:12160-4.

Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S, Shibuya M. A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene* 1995;10:135-47.

Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* 1998;141:1659-73.

Seidman H, Mushinsky MH, Geib SK, et al. Probabilities of eventually developing or dying of cancer-United States, 1985. *CA35:36-56*,1985.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak A, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak H. Tumors cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983,219:983.

Senger DR, Dvorak HF. Vascular permeability factor: a protein mediator that induces tumor vessel hyperpermeability and promotes endothelial cell growth. *Human Astrocytomas*. Edited by PM Black and L Lampson. London, Blackwell Scientific Publications 1993:250-60.

Senger DR, Van der Water L, Brown L, Nagy J, Yeo KT, Bence M, Jackman R, Dvorak A, Dvorak H. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Reviews*. 1993, 12:303.

Sepp NT, Li L-J, Lee KH, et al. Basic fibroblastic growth factor increases expression of the $\alpha v\beta 3$ integrin complex on human microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 1994;103:295-503.

Serth J, Panitz F, Paeslack U, Kuczyk MA, Jonas U. Increased levels of human-papillomavirus type 16 DNA in a subset of prostate cancers. *Cancer Res* 1999;59:823-825.

Shabaik AS, Krajewski S, Burgan A, Krajewska M, Reed JC. Bcl-2 proto-oncogen expression in normal, hyperplastic and neoplastic prostate tissue. *Lab Invest* 1994;70:A83.

Shah R, Mucci NR, Amin A, Macoska JA, Rubin MA. Postatrophic Hyperplasia of the Prostate Gland: Neoplastic Precursor or Innocent Bystander. *Am J Surg Pathol* 2001;158:1767-1773.

Shaheen RM, Davis DW, Liu W, et al. Antiangiogenic therapy targeting the tyrosin kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis. *Cancer Res* 1999;59:5412-16.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* 1995;376:62-66.

Shannon RL, Ro JY, Gignon DJ, et al. Sarcomatoid carcinoma of the prostate, a clinical pathologic study of 12 patients. *Cancer* 1992;69:2676-82.

Sharma-Wagner S, Chokkalingam AP, Malaker HSR, Stone BJ, McLaughlin JK, Hsing AW. Occupation and prostate cancer risk in Sweden. *JOEM* 2000;42:517-525.

Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosin kinase (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990;8:519-27.

Shifren JL, Doldi N, Ferrara N, Mesiano S, Jaffe RB. In the human fetus, vascular endothelial growth factor is expressed in epithelial cells and myocytes, but not vascular endothelium: implications for mode of action. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:316-22.

Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, Yeo KT, Yeo TK, Allende R, Folkman J, D'Amore PA. Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as a mitogen. *Mol Med* 1995;1:182-93.

Shimada A, Kimura S, Abe K et al. Immunocytochemical staining of estrogen receptor in paraffin sections of human breast cancer by use of monoclonal antibody: comparison with that in frozen sections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4803-4807.

Shiraishi A, Ishiwata T, Shoji T, Asano J. Expression of PCNA, basic fibroblast growth factor, FGF-factor receptor and vascular endothelial growth factor in adenomas and carcinomas of human colon. *Acta Histochem. Cytochem* 1995;28:21.

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-5.

Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:768-72.

Signoretti S, Montironi R, Manola J, et al. Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1918-25.

Smallwood PM, Munoz-Sanjuan I, Tong P, Macke JP, Hendry SHC, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:6507-6511.

Smith CV, Bauer JJ, Conelly RR, Seay T, Kane C, Foley J, Thrasher B, Kusuda L, Moul JW. Prostate cancer in men age 50 years or younger: a review of the department of defense center for prostate disease research multicenter prostate cancer database. *J Urol* 2000;164:1964-67.

Smith-McCune KK, Weidner N, Bishop JM. Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) is angiogenic. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 1993;34:74.

Smith-McCune K, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res* 1994;54:800-4.

Stackhouse GB, Sesterhenn IA, Bauer JJ, et al. p53 and bcl-2 immunohistochemistry in pretreatment prostate needle biopsies to predict recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol* 1999;162:2040-5.

Steeland K, Nowlin S, Palu S. Cancer incidence in the National Health and Nutrition Survey. I. Follow-up data: diabetes, cholesterol, pulse and physical activity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:807-811.

Stein A, deKernion JB, Smith RB, et al. Prostatic specific antigen after radical prostatectomy in patients with organ confined and locally extensive prostate cancer. *J Urol* 1992; 147:942-946.

Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan Ling T, Keshet E. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci* 1995;15:4738-47.

Story MT, Sasse J, Jacobs SC, et al. Prostatic growth factor: purification and structural relationship to basic fibroblast growth factor. *Biochemistry* 1987;26:3843-3849.

Strohmeier D, Rossing C, Bauerfeind A, Kaufmann O, Schlechte H, Bartsch G, Loening S. Vascular endothelial growth factor and its correlation with angiogenesis and p53 expression in prostate cancer. *Prostate* 2000;45(3):216-24.

Strömblad S, Becker JC, Yebra M, Brooks PC, Cheresh DA. Suppression of p53 activity and p21 WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin $\alpha v\beta 3$ during angiogenesis. *J Clin Invest* 1996;98:426-33.

Sun Y, Lin J, Katz AE, Fisher PB. Human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 is expressed in human tumor cell lines and prostate carcinoma patient blood samples. *Cancer Res* 1997;57:18-23.

Suri C, et al. Requisite role of Angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87:1171-80.

Suri C, McClain J, Thurston G, et al. Increased vascularization in mice over-expressing angiopoietin-I. *Science*, 1998;282:468-71.

Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y, Yamamoto M, Ohkawa K, Ito Y, Sasaki Y, Yamaguchi Y, Nakase H, Noda K, Enomoto N, Arai K, Yamada Y, Yoshihara H, Tujimura T, Kawano K, Yoshikawa K, Kamada T. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:3004-9.

Swinnen K, Caillaud J, Heyns W, et al. Prostatic stromal cells and testicular peritubular cells produce similar paracrine mediators of androgen action. *Endocrinology* 1990;126:142-150.

I

Takagi H, King GL, Ferrara N, Aiello LP. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor receptor KDR/flk gene expression through adenosine A2 receptors in retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1311-21.

Takahashi R, Tanaka S, Kitadai Y, Sumii M, Yoshihara M, Haruma K, Chamaya K. Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. *Oncology* 2003;64:266-274.

Takahashi Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. p53, vessel count, and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer. *Int J Cancer* 1998;79:34-38.

Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995;55:3964-68.

Takamani I, Tanaka F, Hashimizu T. Vascular endothelial growth factor and its receptors correlate with angiogenesis and survival in pulmonary adenocarcinoma. *Anti-cancer Res* 1997;12:2811-2814.

Tamboli P, Amin MB, Schultz DS, Linden MD, Kubus J. Comparative analysis of nuclear proliferative index (Ki67) in benign prostate, prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *Mod Pathol* 1996;9:1015-9.

Tamboli P, Amin MB, Xu HJ, Linden MD. Immunohistochemical expression of retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes in prostatic intraepithelial neoplasia: comparison with prostatic adenocarcinoma and benign prostate. *Mod Pathol* 1998;11, 247-252.

Teo NB, Shocker BS, Martin L, Sloane JP, Holcombe C. Angiogenesis in pre-invasive cancer. *Anticancer Res*, 2002;22(4):2061-72.

Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1990;6:1677-83.

Terman BI, Dougher Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bolhen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187:1579-86.

Thomas KA, Riley MC, Lemmon SK, Baglan NC, Bradshaw RA. Brain fibroblast growth factor. Nonidentity with myelin basic protein fragments. *J Biol Chem* 1980;255:5517-5520.

Tipoe GL, Jin Y, White FH. The relationship between vascularity and cell proliferation in human and pathological lesions of the oral cheek epithelium. *Eur J Cancer* 1996;1:24-31.

Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266:11947-54.

Toi M, Kondo S, Suzuki H, Yamamoto Y, Inada K, Imazawa T, Taniguchi T, Tominaga T. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. *Cancer* 1996;77:1101-6.

Tsai JC, Goldman CK, Gillespie GY. Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF. *J Neurosurg* 1995;82:864-73.

Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93:705-16.

Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute and to chronic hypoxia. *J Clin Invest* 1995;95:1798-807.

U

Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992;153:557-62.

V

Vaisman N, Gospodarowicz D, Neufeld G. Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1990;265:19461-66.

Van Brussel JP, Mickisch GHJ. Prognostic factors in prostate and testis cancer. *BJU International* 1999;83:910-917.

Van de Rijn M, Rouse RV. CD34: a review. *Appl Immunohistochem* 1994;2:71-80.

Van der Kwast TH, Labrie F, Tetu B. Persistence of high-grade prostatic intra-epithelial neoplasia under combined androgen blockade therapy. *Hum Pathol* 1999;30:1503-7.

Van Meir EG, Polverini PJ, Chazin VR, Su Huang HJ, de Tribolet N, Cavenee WK. Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of wild type p53 expression in glioblastoma cells. *Nat Genet* 1994 Oct;8(2):171-6.

Vartanian RK, Weidner N. Correlation of intratumoral endothelial-cell proliferation with microvessels density (tumor angiogenesis) and tumor-cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol* 1994;144:1188-1194.

Vartanian RK, Weidner N. Endothelial cell proliferation in prostatic carcinoma and prostatic hyperplasia: correlation with Gleason's score, microvessel density, and epithelial cell proliferation. *Lab Invest* 1995;73(6):844-50.

Vermeulen PB, Verhoeven D, Hubens G, Van Marck E, Goovaerts G, Huyghe M, et al. Microvessel density, endothelial cell proliferation and tumor cell proliferation in human colorectal adenocarcinomas. *Ann Oncol* 1995;6:59-64.

Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Quantification of Angiogenesis in Solid Human Tumors: an International Consensus on the Methodology and Criteria of Evaluation. *European Journal of Cancer* 1996;32^a,14:2474-2484.

Viglietto G, Romano A, Maglione D, Rambaldi M, Paoletti I, Lago CT, Califano D, Monaco C, Mineo A, Santelli G, Manzo G, Botti G, Chiapetta G, Persio MG. Neovascularization in human germ cells tumors correlates with a marked increase in the expression of vascular endothelial growth factor but not the placenta-derived growth factor. *Oncogene* 1996;13:577-87.

Vilora-Petit AM, RakJ, Hung M-C, Rockwell P, Goldstein N, Kerbel RS. Neutralizing antibodies against EGF and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate VEGF production by tumor cells *in vitro* and *in vivo*. Angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 1997;151:1523-1530.

Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persio G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93:1493-95.

Vis AN, Noordzij MA, Fitoz K, Wildhagen MF, Schroder FH, van der Kwast TH. Prognostic value of cell cycle proteins p27(kip1) and MIB-1 and the cell adhesion protein CD44s in surgically treated patients of prostate cancer. *J Urol* 2000;164(6):2156-61.

Visakorpi T, Kallioniemi O-P, Heikkinen A, et al. Small subgroup of aggressive, highly proliferative prostatic carcinomas defined by p53 accumulation. *J Natl Cancer Inst* 1991;84:883-7.

Volm M, Koomagi R, Mattern J, Stammers G. Angiogenic growth factors and their receptors in non-small cell lung carcinomas and their relationships to drug response in vitro. *Anticancer Res* 1997;17:99-103.

Volm M, Koomagi R, Mattern J. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. *Int J Cancer* 1997;74:64-68.

W

Waltenberger J, Claesson Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994;269:26988-95.

Wang HU, Chen Z, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998;93:741-53.

Wang J, Xu H, Li H, Goldfarb M. Broadly expressed SNT-like proteins link FGF receptor stimulation to activators of Ras. *Oncogene* 1996;13:721-729.

Wang JM, Kumar S, Pye D, van Agthoven AJ, Krupinski J, Hunter RD. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumors and normal tissues. *Int J Cancer* 1993;54:363-370.

Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP. Purification of a human prostatic specific antigen. *Invest Urol* 1979;17:159-163.

Wang YZ, Wong YC. Oncogenes and tumor suppressor genes in prostate cancer: a review. *Urol Oncol* 1997;3:41-6.

Ware JL. Prostate cancer progression. Implications of histopathology. *Am J Pathol* 1994;145:893-993.

Warren RS, Yuan H, Matli MR. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastases. *J Clin Invest* 1995;95:1789-1797.

Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, Donner DB. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem* 1996;271:29483-88.

Watanabe II, Nguyen M, Schizer M. Basic fibroblast growth factor in human serum- a prognostic test for breast cancer. *Mol Biol Cell* 1992;3:324a.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8.

Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1875-87.

Weidner N. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Sem Diag Pathol* 1993;10:302-13.

Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor Angiogenesis correlates with Metastasis in Invasive Prostate Carcinoma. *Am Journal Surg Pathol* 1993;143n2:401-409.

Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995;147:9-19.

Weidner N. Angiogenesis as a predictor of clinical outcome in cancer patients (letter) . *Hum Pathol* 2000;31(4):403-405.

Werner S, Duan D-SR, de Vries C, Peters KG, Johnson DE, Williams LT. Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor 1 generates receptor variants with different ligand-binding specificities. *Mol Cell Biol* 1992;12:82:88.

Wheeler TM, Dilliogluligil O, Kattan MW, Arakawa A, Soh S, Suyama K, Ohori M, Scardino PT. Clinical and pathological significance of the level and extent of capsular invasion in clinical stage T1-2 prostate cancer. *Hum Pathol* 1998;29(8).856-62.

Whitemore WF Jr. Symposium on hormones and cancer therapy; hormone therapy in prostate cancer. *Am J Med* 1956;21:697-713.

Wilbur DC, Willis J, Mooney RA, Fallon MA, Moynes R, Di Sant'Agnese PA. Estrogen and progesterone receptor detection in archival formalin-fixed, paraffin embedded tissue from breast carcinoma: a comparison of immunohistochemistry with the dextran-coated charcoal assay. *Mod Pathol* 1992;5:79-84.

Wilting J, Birkenhäger R, Eichman A, Kurz H, Martiny-Baron G, Marmé D, McCarthy JEG, Christ B, Weich HA. VEGF121 induces proliferation of vascular endothelial cells and expression of flk-1 without affecting lymphatic vessels of the chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 1996;176:76-85

Wingo PA, Landis S, Ries LA. An adjustment to the 1997 estimate for new prostate cancer cases. *CA Cancer J Clin* 1997;47:239-242.

Winkler HC, Rainwater LM, Myers RP, et al. Stage D1 prostatic carcinoma: significance of DNA ploidy patterns studied by flow cytometry. *Mayo Clin Proc* 1988;63:103-12.

Wizigmann Voos, Breier J, Risau W, Plate K. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer Res* 1995;55:1358.

Y

Yamasaki M, Miyake A, Tagashira S, Itoh N. Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 1996;271:15918-15921.

Yan G, Fukabori Y, McBride G, et al. Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)- FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol Cell Biol* 1993;13:4513-4522.

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242-8.

Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27:838-44.

Yang XJ, Wu CL, Woda BA, Dresser K, Tretiakova M, Fanger GR, Jiang Z. Expression of α -Methylacyl-CoA Racemase (P504S) in atypical adenomatous hyperplasia of the prostate. *Am J Surg Pathol* 2002;26:921-925.

Yoshiji H, Gómez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res* 1996;56:2013-16.

Young RH, Srigley JR, Amin MB, Ulbright TM, Cubilla AL, eds. Tumors of the prostate gland, seminal vesicles, male urethra and penis. AFIP. Washington DC;2000.

Yuan F, Chen Y, Dellian M, Safabakhsh N, Ferrara N, Jain RK. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14765-70.

Z

Zagzag D, Amirnovin R, Greco MA, et al. Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis. *Lab Invest* 2000;80:837-49.

Zhan X, Botes S, Hu X, Goldfarb M. The human FGF-5 oncogene encodes a novel protein related to fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol* 1988;8:3487-3495.

Zhang Y, Kreger BE, Dorgan JF et al. Parental age at child's birth and son's risk of prostate cancer. *Am J Epidemiol* 1999;150:1208-1212.

Zhukova LG, Zhukov NV, Lichinitser MR. Expression of Flt-1 and Flk-1 receptors for vascular endothelial growth factor on tumor cells as a new prognostic criterion for locally advanced breast cancer. *Bull Exp Biol Med* 2003;135(5):478-81.

Zubiri A, Cuchí T, Abadía MJ, eds. Estadística Oncológica de la Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer. Años 1995 y 1996. Zaragoza.

ANEXO I

Tabla 1. Factores inductores de la angiogénesis *in vivo*, producidos por las células tumorales.

| FACTOR INDUCTOR | TEJIDO (demostración de actividad angiogénica <i>in vivo</i>) | EFECTO SOBRE LA CÉLULA ENDOTELIAL |
|---|---|--|
| VEGF (fact.crecim.vascular endotelial o fact.de permeabilidad vascular o vasculotropina) | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • Síntesis DNA • Proliferación celular • Migración celular |
| EGF (fact.crecim.epidérmico) | <ul style="list-style-type: none"> • Córnea • Saco bucal hamster | <ul style="list-style-type: none"> • Síntesis DNA • Proliferación celular • Migración celular |
| FGF-1 (fact.crecim.fibroblástico ácido o 1) | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) • Córnea • Implante tisular | <ul style="list-style-type: none"> • Síntesis DNA • Proliferación celular • Migración celular |
| FGF-2 (fact.crecim.fibroblástico básico o 2) | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) • Córnea • Implante tisular | <ul style="list-style-type: none"> • Síntesis DNA • Migración celular • Formación de túbulos |
| FGF-4 (fact.crecim.fibroblástico 4 o bst-1, K-FGF) | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) • Córnea • Implante | <ul style="list-style-type: none"> • Síntesis DNA • Proliferación celular |
| G-CSF (fact.estimulante de colonias granulocitario) | <ul style="list-style-type: none"> • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • Síntesis DNA • Proliferación celular |
| IGF-1 (fact.crecim.insulin-like-1) | <ul style="list-style-type: none"> • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • Migración celular • Formación de túbulos |
| IL-8 (interleucina 8) | <ul style="list-style-type: none"> • Córnea • Implante tisular | <ul style="list-style-type: none"> • Proliferación celular • Migración celular |
| PDGF (fact.crecim.deriv.de plaquetas) | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • Síntesis DNA • Proliferación celular • Migración celular |

| | | |
|--|---|---|
| TGF α (fact.transformante α) | <ul style="list-style-type: none"> • Córnea • Saco bucal hamster | <ul style="list-style-type: none"> • Síntesis DNA |
| TGF β (fact.transformante β) | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) • Córnea • Implante tisular | <ul style="list-style-type: none"> • Migración celular • Formación de túbulos • Inhibición de la proliferación |
| TNF α (fact. necrosis tumoral α) | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • Migración celular • Inhibición de la proliferación y la formación tubular |
| TP (timidin fosforilasa) | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) • Implante | <ul style="list-style-type: none"> • Migración celular • Quimiotaxis |

OTRAS PROTEINAS Y PÉPTIDOS

| FACTOR INDUCTOR | TEJIDO (demostración de actividad angiogénica in vivo) | EFECTO SOBRE LA CÉLULA ENDOTELIAL |
|--------------------------------------|---|---|
| ANGIOGENINA | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • No produce efecto en la proliferación celular |
| FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETAS | <ul style="list-style-type: none"> • Implante | <ul style="list-style-type: none"> • Proliferación y migración celular |
| PROLIFERINA | <ul style="list-style-type: none"> • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • Migración celular |
| SUBSTANCIA P | <ul style="list-style-type: none"> • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • Síntesis DNA • Migración celular |
| UROKINASA (uPA) | <ul style="list-style-type: none"> • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • Migración celular |
| VCAM-1 (mol.de adhesión vascular) | <ul style="list-style-type: none"> • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • Quimiotaxis |

CARBOHIDRATOS

| | | |
|------------------------------------|---|---|
| FRAGMENTOS DE ÁCIDOS HIALOURÓNICOS | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) • Implante | <ul style="list-style-type: none"> • Síntesis DNA • Migración celular |
| LACTATO | <ul style="list-style-type: none"> • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • No produce efecto en la proliferación celular |

LÍPIDOS

| | | |
|----------------------------------|--|---|
| ERUCAMIDA | <ul style="list-style-type: none">• Membrana coriónico-alantoidea (CAM)• Córnea | <ul style="list-style-type: none">• No produce efecto en la proliferación celular |
| LEUCOTRIENOS C4 Y D4 | <ul style="list-style-type: none">• Membrana coriónico-alantoidea (CAM) | <ul style="list-style-type: none">• Migración celular |
| PROSTAGLANDINAS PG E1 Y PG E2 | <ul style="list-style-type: none">• Membrana coriónico-alantoidea (CAM)• Implante | <ul style="list-style-type: none">• Proliferación celular |

OTRAS SUBSTANCIAS

| | | |
|------------|--|--|
| ESTRÓGENOS | <ul style="list-style-type: none">• Implante | <ul style="list-style-type: none">• Proliferación y migración celular• Formación de túbulos |
|------------|--|--|

ANEXO II

Tabla 2. Factores angiogénicos que pueden actuar como oncogenes.

EGF
FGF-1 / FGF-a
FGF-2 / FGF-b
FGF-3 / int-2
FGF-4 / K-FGF/ hst-1
G-CSF
PDGF-B / sis
TGF α
TGF β

Tabla 3. Oncogenes que estimulan la producción de factores angiogénicos.

| ONCOGEN | TIPO CELULAR | FACTOR ANGIOGÉNICO |
|----------|--|--|
| v- abl | Fibroblasto rata | TGF α |
| v- erb A | Glial | PDGF- B |
| v- fps | Fibroblastos embrión pollo | PG E2 y E3 |
| v- mos | Fibroblastos embrión pollo | PG E2 |
| c- myb | Fibroblastos murinos | IGF- 1 |
| H- ras | Fibroblasto humano Tiroides humano Fibroblasto rata Célula intestinal rata Células cáncer colon humano | G- CSF IGF- 1 PG E2 VEGF VEGF |
| v-H-ras | Célula mama humano Fibroblasto murino Queratinocitos murinos | TGF α , TGF β , IGF-1 TGF α TGF α , TGF β |
| K-ras | Fibroblasto murino | TGF α |
| N-ras | Cél. Melanoma humano Cél. Mesotelioma humano Fibroblasto murino | TNF α G-CSF TGF α |
| ras | Fibroblastos embrión pollo Fibroblastos murinos | PG E2 SF |
| ros | Fibroblastos embrión pollo | PG E2 |
| sis | Fibroblasto murino | SF |
| src | Fibroblastos embrión pollo Fibroblastos murinos | PG E2, VEGF TGF α , TGF β |
| v-src | Glioblastoma humano | VEGF |

ANEXO III

Tabla 4. Sustancias inhibidoras de la angiogénesis producidas por células normales de mamíferos .

| INHIBIDOR | ENSAYO IN VIVO | ACTIVIDADES INHIBIDAS ENDOTELIO | ACTIVIDAD ANTITUMORAL |
|-------------------------------------|--|---|-----------------------|
| ANGIOSTATINA | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • Proliferación celular | SI |
| 1,25 Dihidroxivitamina (D3) | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) | <ul style="list-style-type: none"> • Proliferación celular | SI |
| Interferon α (INF α) | <ul style="list-style-type: none"> • Piel de ratón | <ul style="list-style-type: none"> • Migración y proliferación celular | SI |
| Interferon β (INF β) | <ul style="list-style-type: none"> • Piel de ratón | <ul style="list-style-type: none"> • Migración y proliferación celular | SI |
| Interferon γ (INF γ) | <ul style="list-style-type: none"> • Piel de ratón • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • Proliferación celular • Síntesis de DNA • Formación de cordones celulares | SI |
| Interleucina-1 (IL-1) | <ul style="list-style-type: none"> • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • Migración y proliferación celular • Síntesis de DNA | SI |
| Interleucina-12 (IL-12) | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) | <ul style="list-style-type: none"> • No en proliferación celular | SI |
| 2- methoxiestradiol | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) • Vasos tumorales | <ul style="list-style-type: none"> • Proliferación celular • Formación de cordones celulares | SI |

| | | | |
|--|---|--|----|
| Factor plaquetario 4 (PF4) | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) | <ul style="list-style-type: none"> • Proliferación celular • Síntesis de DNA | SI |
| Proteína reaccionada con la proliferina (PRP) | <ul style="list-style-type: none"> • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • Migración celular | ? |
| Fragmento de 16 Kd de la prolactina | <ul style="list-style-type: none"> • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • Síntesis de DNA • Formación de cordones celulares | SI |
| Inhibidor de la ribonucleasa placentaria | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) • Córnea | ? | SI |
| Protamina | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • Proliferación celular | SI |
| Ácido retinoico | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) | <ul style="list-style-type: none"> • Migración celular | SI |
| Trombospondina (TSP-1) | <ul style="list-style-type: none"> • Córnea • Implante | <ul style="list-style-type: none"> • Migración y proliferación celular • Formación de cordones y luces celulares | SI |
| Inhibidor tisular de la Metaloproteinasa (TIMP/ CD 1) | <ul style="list-style-type: none"> • Membrana coriónico-alantoidea (CAM) • Córnea | <ul style="list-style-type: none"> • Migración y proliferación celular • Síntesis de DNA | SI |

ANEXO IV

Tabla 7. Genes supresores tumorales que influyen en la angiogénesis.

| GEN SUPRESOR TUMORAL | TIPO CELULAR | EFEECTO EN LA ANGIOGÉNESIS | INHIBIDOR INDUCIDO |
|-----------------------------|--|--|---|
| p 53 | <ul style="list-style-type: none"> • Glioblastoma • Fibroblastos • Carcinoma de mama | <ul style="list-style-type: none"> • Inhibidor • Inhibidor • Inhibidor | <ul style="list-style-type: none"> ? • Trombospondina-1 • Trombospondina-1 |
| RB | <ul style="list-style-type: none"> • Retinoblastoma • Osteosarcoma • Tumor prostático | <ul style="list-style-type: none"> • Inhibidor • Inhibidor • Sin efecto | <ul style="list-style-type: none"> ? ? ? |
| CR.10 q | <ul style="list-style-type: none"> • Glioblastoma | <ul style="list-style-type: none"> • Inhibidor | <ul style="list-style-type: none"> • Trombospondina-1 |
| CR.17 | <ul style="list-style-type: none"> • Neuroblastoma | <ul style="list-style-type: none"> • Inhibidor | <ul style="list-style-type: none"> ? |