



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Nous biomarcadors per la detecció i pronòstic del càncer de pròstata

Laura Foj Capell

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

TESI DOCTORAL

**NOUS BIOMARCADORS PER LA DETECCIÓ I PRONÒSTIC
DEL CÀNCER DE PRÒSTATA**

Memòria presentada per

Laura Foj Capell

Per optar al títol de

Doctor per la Universitat de Barcelona

Programa Medicina

Aquesta tesi s'ha realitzat sota la direcció del Dr. Xavier Filella Pla, al Servei de Bioquímica i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic de Barcelona.

Director:

Dr. Xavier Filella Pla

Tutor:

Dr. Wladimiro Jiménez Povedano

Barcelona, abril de 2017

ABREVIATURES

ANN: artificial neural network

ARNm: ARN missatger

AUC: àrea sota la corba

cADN: ADN complementari

CAFs: fibroblasts associats al càncer

CaP: càncer de pròstata

CRPC: càncer de pròstata resistent a castració

EMT: transició epiteli-mesenquimal

ERSPC: European Randomized Study of Prostate Cancer

FDA: Food and Drug Administration

fPSA: PSA lliure

HBP: hiperplàsia benigna de pròstata

hK2: cal·licreïna humana de tipus 2

MET: transició mesènquima-epitelial

miARN: microARN

PCA3: prostate cancer gene 3

PCPT-CRC: North American Prostate Cancer Prevention Trial based Cancer Risk Calculator

PHI: prostate health index

PLCO: Prostate, Lung, Colorectal and Ovary screening trial

PSA: antigen específic de pròstata

PSAD: densitat de PSA

%fPSA: percentatge de PSA lliure

%[-2] proPSA: percentatge de [-2] proPSA

qRT-PCR: *Quantitative Real-Time PCR*

RL: Regressió Logística

ROC: Receiver Operating Characteristic

RWE: efecte Warburg revers

SWOP-PRI: Prostate Risk Indicator de l'ERSPC

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	1
1. El càncer de pròstata	3
1.1 Característiques generals del càncer de pròstata: epidemiologia, classificació	3
1.2 Càncer de pròstata agressiu versus càncer de pròstata insignificant	6
2. L'antigen específic de pròstata (PSA)	11
2.1 Característiques generals	11
2.2 Ús del PSA en el cribratge del càncer de pròstata	13
2.3 Estratègies per millorar l'especificitat del PSA	14
3. Nous biomarcadors emergents per al diagnòstic i pronòstic del càncer de pròstata	17
3.1 Prostate Cancer Gene 3 (<i>PCA3</i>)	17
3.1.1 <i>Biologia de PCA3</i>	17
3.1.2 <i>Utilitat diagnòstica de PCA3</i>	18
3.1.3 <i>Relació de l'índex de PCA3 amb l'agressivitat del CaP</i>	20
3.2. [-2]proPSA i <i>prostate health index</i> (PHI)	26
3.2.1 <i>Isoformes de PSA lliure. Definició de PHI</i>	26
3.2.2 <i>Utilitat diagnòstica de [-2]proPSA i PHI</i>	27
3.2.3 <i>Relació de [-2]proPSA i PHI amb l'agressivitat del CaP</i>	30
3.2.4 <i>Inclusió de [-2]proPSA i PHI en models multivariats</i>	30

3.3. Perfil de 4 cal·licreïnes. Índex 4K	32
3.4. Gen de fusió <i>TMPRSS2:ERG</i>	35
3.4.1 <i>Utilitat diagnòstica i pronòstica del gen de fusió TMPRSS2:ERG</i>	36
3.5. microARNs	38
3.5.1 <i>Biogènesi i funció dels microARNs</i>	38
3.5.2 <i>Paper dels miARNs en el càncer de pròstata</i>	40
3.5.3 <i>Expressió de miARNs en càncer de pròstata</i>	43
3.6. Exosomes i càncer de pròstata	46
HIPÒTESI I OBJECTIUS	53
DISCUSSIÓ	57
CONCLUSIONS	73
BIBLIOGRAFIA	77
ANNEX	105
• <i>Clinical utility of %p2PSA and prostate health index in the detection of prostate cancer</i>	107
• <i>The influence of prostate volume in prostate health index performance in patients with total PSA lower than 10 µg/L</i>	117
• <i>Real-time PCR PCA3 assay is a useful test measured in urine to improve prostate cancer detection</i>	123
• <i>Exosomal and Non-Exosomal Urinary miRNAs in Prostate Cancer Detection and Prognosis</i>	129
AGRAÏMENTS	141

INTRODUCCIÓ

I. EL CÀNCER DE PRÒSTATA

1.1 Característiques generals del càncer de pròstata: epidemiologia, classificació

El càncer de pròstata (CaP) és actualment el segon càncer més freqüent en els homes després del càncer de pulmó (sense tenir en compte els càncers de pell no melanoma) i la cinquena causa de mort per càncer entre els homes a tot el món (1). En els països desenvolupats, ocupa el primer lloc en freqüència, sobrepasant el càncer de pulmó. A Catalunya, el CaP és el tumor més freqüent en els homes, seguit del de pulmó i el colorectal, segons les últimes dades contrastades que són de l'any 2007 (2). El pronòstic del CaP ha millorat en els darrers anys, ja que es diagnostica en estadis més inicials (3), en bona part, a causa de la introducció de la mesura de l'antigen específic de la pròstata (PSA) en la seva detecció.

El CaP és un tumor de creixement lent, i del qual és vital diferenciar-ne els tumors confinats a la glàndula prostàtica dels tumors localment avançats. El sistema de classificació TNM valora l'extensió local del tumor (T), l'afectació ganglionar (N) i la presència de metàstasis, segons les dades obtingudes mitjançant les proves diagnòstiques, que inclouen tacte rectal, PSA i proves d'imatge (ecografia, gammagrafia òssia, ressonància magnètica, TAC i PET). Cal diferenciar entre l'estadi clínic, que es basa en les proves esmentades, i l'estadi patològic, obtingut a partir de l'estudi de la pròstata extirpada en la cirurgia. La taula 1 presenta la classificació TNM.

El grau de Gleason és el sistema més utilitzat per valorar la diferenciació del CaP. A cada tumor, segons la seva diferenciació, se'l puntua en una escala de l'1 al 5. A les cèl·lules tumorals amb una semblança a les cèl·lules normals se'ls assigna una puntuació baixa, mentre que a les cèl·lules més indiferenciades se'ls assigna una puntuació alta. En cada tumor es considera el patró més freqüent i el segon patró més freqüent, de manera que a cada tumor se li assigna un grau entre 2 i 10.

INTRODUCCIÓ

Taula 1. Classificació del càncer de pròstata: TNM.

T: Tumor primari	N: Ganglis limfàtics regionals	M: Metàstasis a distància
Tx : No es pot avaluar el tumor primari.	Nx: No es poden avaluar els ganglis limfàtics regionals.	Mx: No es poden avaluar les metàstasis a distància.
T0: No hi ha evidència de tumor primari.		
T1: Tumor no evident clínicament, no palpable ni visible per mitjà de tècniques d'imatge.		
T1a: Tumor detectat com una troballa en una extensió menor o igual al 5% del teixit ressecat.	N0: No es demostren metàstasis ganglionars regionals.	M0: No hi ha metàstasis a distància.
T1b: Tumor detectat com una troballa en una extensió major del 5% del teixit ressecat.		
T1c: Tumor identificat per mitjà d'una biòpsia.		
T2: Tumor limitat a la pròstata.	N1: Metàstasis a ganglis limfàtics regionals.	M1: Metàstasis a distància
T2a: El tumor abasta la meitat d'un lòbul o menys.		
T2b: El tumor abasta més de la meitat d'un lòbul però no ambdós lòbuls.		
T2c: El tumor abasta ambdós lòbuls.		
T3: Tumor que s'estén a través de la càpsula prostàtica.		
T3a: Extensió extracapsular unilateral o bilateral.		
T3b: Tumor que envaeix les vesícules seminals.	M1a: Gangli/s limfàtic/s no regionals.	
T4: Tumor fix o que envaeix estructures adjacents diferents de les vesícules seminals: coll vesical, esfínter extern, recte, músculs elevadors de l'anus i/o paret pèlvica.		M1b: Ossos.
		M1c: Altres localitzacions

Un grau de Gleason de 7 es considera un tumor amb una diferenciació mitjana, mentre que puntuacions superiors a 7 es consideren tumors més indiferenciats i agressius. A més a més, els tumors amb grau de Gleason 7 es poden subclassificar en dos grups, amb pronòstics diferents: 3+4 i 4+3, segons que el patró més freqüent sigui 3 o 4. Els tumors amb un grau de Gleason menor a 7 tenen un creixement lent i per tant un millor pronòstic. Finalment, cal diferenciar entre el grau de Gleason obtingut en la biòpsia i el grau de Gleason que resulta de l'estudi de la pròstata obtinguda en la prostatectomia radical.

La prostatectomia radical i la radioteràpia són els tractaments d'elecció en el CaP localitzat i tenen una intenció curativa. En tumors amb un baix risc de progressió (PSA < 10 µg/L, grau de Gleason de la biòpsia < 7, i estadi clínic T1c–T2a) es pot optar per una estratègia de vigilància activa, que consisteix a diferir el tractament fins al moment en què es detecta la

INTRODUCCIÓ

progressió del tumor. L'hormonoteràpia i la quimioteràpia es reserven per tumors més avançats.

Segons l'*American Cancer Society*, la majoria de CaP (92%) són detectats en un estadi local o regional, amb una supervivència als 5 anys propera al 100%. En el curs dels darrers 25 anys, segons dades d'aquesta societat, la supervivència als 5 anys ha augmentat del 68% al 99%, en gran part a causa de la detecció de CaP indolents. La supervivència als 10 i 15 anys del CaP és del 98 i 95%, respectivament (4).

El PSA segueix sent actualment el biomarcador més usat en la detecció precoç del CaP, malgrat els coneguts inconvenients inherents al seu ús (5). Un d'aquests inconvenients és la seva falta d'especificitat, ja que diverses patologies prostàtiques benignes (hiperplàsia benigna de pròstata –HBP- o la prostatitis aguda) es relacionen amb una concentració elevada de PSA. La biòpsia de la pròstata, de fet, tan sols és positiva en el 25% dels malalts amb PSA entre 2 i 10 µg/L (6). D'altra banda, l'ampli ús del PSA ha derivat en la detecció d'un nombre creixent de tumors de baix risc, de manera que el sobrediagnòstic i el sobretractament del CaP afecten entre el 27 i el 56% dels nous diagnòstics que es realitzen (7,8).

En conseqüència, és necessari identificar nous biomarcadors més precisos que permetin la detecció del CaP en una etapa inicial i poder distingir els tumors agressius dels clínicament insignificants.

En el curs dels darrers anys s'han descrit nous biomarcadors, amb l'objectiu d'augmentar l'especificitat diagnòstica obtinguda amb l'ús del PSA i de diferenciar entre tumors agressius i tumors clínicament insignificants (9-10). Entre aquests nous biomarcadors hi ha el prostate health index (PHI) -calculat a partir de les concentracions sèriques de PSA total, PSA lliure (fPSA) i [-2] proPSA-, i el perfil de 4 cal·licreïnes, que inclou PSA total, fPSA, PSA intacte i cal·licreïna humana de tipus 2 (hk2). Paral·lelament, l'estudi del gen *PCA3* constitueix una altra via per millorar l'eficàcia diagnòstica del CaP. Encara més recentment, l'estudi dels microARNs (miARNs) constitueix un altre intent per descriure nous biomarcadors amb utilitat en la detecció i pronòstic del CaP.

1.2 Càncer de pròstata agressiu versus càncer de pròstata insignificant

L'augment en la incidència de CaP en els països occidentals podria ser explicat per la introducció del PSA, tant en relació a la seva àmplia difusió com per l'ús de valors discriminants cada vegada més baixos. Un gran nombre de tumors de pròstata són detectats en etapes inicials, amb un grau de Gleason baix (<7) i amb una molt baixa probabilitat de progressió. El percentatge de CaP de baix risc ha estat estimat per Klotz (11) entre el 50% i el 60% dels nous casos diagnosticats. Des d'un punt de vista terminològic, hi ha dues definicions que s'utilitzen àmpliament per definir conceptes similars, encara que no idèntics: CaP indolent i CaP insignificant. El càncer indolent es defineix per les seves característiques patològiques, sense tenir en compte les circumstàncies del pacient (com l'edat i les comorbiditats), mentre que el càncer insignificant inclou, a més a més dels càncers indolents, els casos de càncer diagnosticats en pacients d'edat avançada o amb comorbiditat significativa. Tot i la distinció terminològica abans esmentada, els termes càncer indolent i insignificant sovint s'utilitzen indistintament.

Epstein et al. (12) el 1994 definiren uns criteris per predir aquells càncers que podrien ser considerats insignificants per tal d'evitar un tractament radical innecessari. Aquest estudi incloïa 157 homes amb CaP no palpable (T1c), diagnosticat per biòpsia i tractats amb prostatectomia radical entre 1989 i 1992. El millor model per predir CaP insignificant fou el definit de la manera següent: densitat de PSA (PSAD) $<0,1 \mu\text{g/L/g}$, grau de Gleason de 6, menys de 3 cilindres afectats, cap nucli amb més del 50% de positivitat. Els criteris d'Epstein van oferir un valor predictiu positiu del 95%, un valor predictiu negatiu del 66% i una precisió del 73%. Els criteris d'Epstein foren posteriorment validats per Bastian et al. (13) l'any 2004, aplicant-los a pacients tractats entre els anys 2000 i 2003, confirmant així la seva utilitat.

D'altra banda, D'Amico et al. (14) van proposar una classificació del CaP en grups de risc. La classificació de D'Amico segueix sent avui dia la més aplicada. Aquesta es basa en el grau de Gleason, la concentració de PSA en sèrum i l'estadi clínic, i segons aquests paràmetres classifica els pacients en 3 grups: baix risc (grau de Gleason < 7 , PSA $\leq 10 \mu\text{g/L}$ i estadi clínic

INTRODUCCIÓ

T1-T2a), risc intermedi (grau de Gleason = 7, PSA entre 10-20 µg/L o estadi clínic T2b), i alt risc (grau de Gleason > 7, PSA > 20 µg/L o estadi clínic T2c). Els autors no suggereixen que el baix risc impliqui l'abstinència terapèutica, malgrat que es van trobar grans diferències en l'evolució dels pacients.

El sobrediagnòstic del CaP és perillós quan va seguit d'un tractament radical, ja que s'aplica un tractament potencialment perjudicial a pacients amb càncers clínicament insignificants. *The Prostate Cancer Outcomes Study* (15), on van participar 1291 pacients que havien estat sotmesos a prostatectomia radical i a un seguiment durant 2 anys, va trobar que el 60% dels pacients presentaven disfunció erèctil; el 43%, problemes en l'esfera sexual; el 42%, incontinència eventual d'orina; el 7%, incontinència freqüent; i l'1,6%, incontinència urinària total. Pel que fa als efectes adversos atribuïts a la radioteràpia, s'han d'esmentar els pacients amb impotència (del 40% al 50%), els pacients amb proctitis (del 2% al 39%), i els pacients amb síndrome de micció irritant (5%). La braquiteràpia, especialment indicada per a tumors de baix risc, també implica certs efectes adversos, com la fistula prostatouretral-rectal (2,7%) o el sagnat rectal intermitent (6,6%).

La vigilància activa està considerada actualment com una estratègia molt valuosa en el maneig del CaP de baix risc, ja que disminueix els efectes negatius del sobrediagnòstic i el sobretractament. Molts d'aquests tumors no interferiran mai en la vida del pacient i poden ser derivats a vigilància activa, la qual consisteix a diferir el tractament i fer controls al pacient cada cert temps, realitzant el tractament quan es detecta una progressió del CaP. Els protocols de vigilància activa inclouen la realització regular d'un tacte rectal i la biòpsia de la glàndula prostàtica, així com mesures seriades de la concentració de PSA en sèrum per valorar-ne l'evolució.

Òbviament, un dels temes més importants en la investigació del CaP és com distingir entre càncer insignificant i càncer potencialment agressiu que posa en perill la vida del pacient. Si els investigadors poguessin predir amb seguretat un CaP insignificant, seria possible un estalvi considerable per als sistemes de salut pública i una millora en el benestar del pacient. Això és particularment important per pacients amb tumors amb graus de Gleason intermitjos, dels quals és molt difícil establir-ne el pronòstic basant-se només en les troballes histopatològiques i clíniques.

Els criteris per la selecció de pacients per a vigilància activa inclouen diverses variables, com són la concentració de PSA en sèrum inferior a 10 µg/L, un grau de Gleason inferior a 7 i

un nombre de cilindres afectats pel tumor baix (16). No obstant, la caracterització del CaP basada en aquests criteris no és ideal (17). La disponibilitat de criteris d'inclusió més precisos milloraria el maneig de pacients amb CaP en estadis inicials.

La disponibilitat de noves tecnologies ha creat una expectativa creixent en la identificació de nous marcadors capaços d'establir una subclassificació molecular del CaP i de distingir-ne els més agressius. En els últims anys, s'han suggerit perfils d'expressió de gens específics per classificar els diferents grups de risc de CaP. Rubin et al. (18) identificaren perfils genòmics específics relacionats amb el grau de Gleason, que mostraven que un nombre menor de mutacions i la falta de poliploidia estaven associades amb tumors amb un grau de Gleason inferior a 7. En aquest sentit, alguns autors han posat en dubte si és adequat etiquetar com a càncer els pacients amb grau de Gleason inferior a 7 (19, 20). D'altra banda, el grau de Gleason s'ha relacionat amb determinats perfils d'expressió de gens, com ara *FOXO1* i *ATG5/GLUT1*, que s'expressen de manera significativament diferent en els patrons 3 i 4. Georgescu et al. (21) analitzaren els perfils d'expressió gènica en el teixit estromal circumdant de càncer de 20 mostres amb patró de Gleason 3 i 21 mostres amb patró de Gleason 4 de pacients amb CaP i graus de Gleason 3+3 i $\geq 4+3$, respectivament. Els perfils d'expressió es van analitzar mitjançant NanoString amb 102 sondes dirigides a gens relacionats amb processos biològics associats a l'efecte Warburg revers (RWE). El RWE és la glicòlisi aeròbica que té lloc als fibroblasts associats al càncer (CAFs) i que dona com a resultat una alta energia obtinguda de subproductes, com el lactat i les cetones, que es transporten a les cèl·lules tumorals, utilitzant-ho aquestes com a combustible per obtenir l'ATP necessari per al creixement anabòlic. En el CaP agressiu, el microambient tumoral exhibeix un fenotip metabòlic recíproc pro-tumorigènic constant amb RWE entre els CAFs i les cèl·lules epitelials canceroses. Els autors suggeriren que l'expressió diferencial de gens associats a RWE es pot utilitzar per classificar el patró de Gleason, distingint el patró de Gleason 3 del patró de Gleason 4. En aquest estudi s'identificaren dos classificadors potencials associats a RWE: el gen *FOXO1*, amb una AUC de 0,884, el qual s'expressa de manera significativament diferent en l'estroma de patrons de Gleason 3 i 4, i *ATG5/GLUT1*, capaç de classificar el patró del Gleason amb una AUC de 0,774. Així doncs, aquests classificadors poden distingir entre formes agressives i indolents de CaP.

Recentment, Ross-Adams et al. (22), en un estudi amb 482 mostres de tumors, mostres benignes i de la línia germinal de 259 homes amb CaP, analitzaren conjuntament les alteracions del nombre de còpies i els resultats d'un *array* d'expressió de gens per tal

INTRODUCCIÓ

d'estratificar els pacients en subgrups associats amb el comportament clínic del tumor. Es van identificar 5 subgrups de pacients amb diferents alteracions genòmiques i perfils d'expressió basats en 100 gens discriminants en dues cohorts independents de descobriment i validació. Aquests subgrups van ser capaços de predir la recidiva bioquímica i van ser validats en una tercera cohort amb seguiment a llarg termini. Els autors confirmaren les alteracions en sis gens prèviament associats amb el CaP (*MAP3K7*, *MELK*, *RCBTB2*, *ELAC2*, *TPD52*, *ZBTB4*), i també identificaren 94 gens no vinculats anteriorment a la progressió del CaP. Es confirmaren una sèrie de canvis moleculars publicats prèviament associats amb el CaP d'alt risc, incloent l'amplificació de *MYC*, i les delecions en *NKX3-1*, *RB1* i *PTEN*, així com sobreexpressió de *PCA3* i *AMACR*, i la pèrdua de *MSMB* en el teixit tumoral. Aquest perfil de 100 gens superarà els predictors clínics de mal pronòstic típics (PSA, grau de Gleason), així com els perfils de gens publicats anteriorment.

De manera similar, els investigadors de la xarxa de recerca del *Cancer Genome Atlas* (TCGA) realitzaren el 2015 una anàlisi molecular global de 333 CaP primaris (23). Els resultats van revelar 7 nous subtipus moleculars de CaP basats en alteracions genètiques conegudes o noves. Dels 7 subtipus, 4 estan caracteritzats per fusions de gens implicant membres de la família ETS de factors de transcripció (*ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *FLI1*), i els altres 3 grups estan definits per mutacions en els gens *SPOP*, *FOXA1* i *IDH1*. El 74% dels tumors analitzats es podien classificar en un dels 7 subtipus moleculars. El 26% restant no es va poder classificar perquè no es van identificar les alteracions moleculars que conduïen al creixement anòmal del tumor. Entre els subtipus de tumors amb mutacions, els que tenen mutacions en *SPOP* i *FOXA1* comparteixen patrons similars de metilació de l'ADN, d'alteració del nombre de còpies i de l'expressió de l'ARNm. D'altra banda, els tumors amb mutació en *SPOP* i *FOXA1* mostraren els nivells més alts de transcripció induïda per *AR*. El 25% dels CaP tenia una alteració en les vies de senyalització PI3K o MAPK, i els gens de reparació de l'ADN estaven inactivats en el 19% dels casos. Aquesta anàlisi revela la gran heterogeneïtat molecular existent en el CaP primari.

D'altra banda, You et al. (24), en un estudi amb una gran cohort virtual ($n = 1.321$) de perfils d'expressió de gens de CaP procedent de 38 cohorts diferents, desenvoluparen un sistema de classificació nou que consisteix en tres subtipus diferents de pacients amb CaP, designats com PCS1, PCS2 i PCS3. Aquest sistema fou validat en 10 cohorts de pacients independents i 19 models de laboratori de CaP, incloent línies cel·lulars i ratolins. L'anàlisi dels perfils d'expressió de gens específics de cada subtipus de CaP mostrà que els tumors PCS1 i PCS2

reflecteixen subtipus luminals, mentre PCS3 representa un subtipus basal. Els autors demostraren que els tumors del subtipus PCS1 (que inclou també tumors de baix grau de Gleason) progressen més ràpidament a malaltia metastàsica i tenen pitjor pronòstic en comparació amb PCS2 o PCS3. Finalment, els autors desenvoluparen un classificador de 37 gens que assigna cada tumor a un dels tres PCS amb precisió. Aquest classificador s'aplicà també a cèl·lules tumorals circulants, mostrant que PCS1 està associat a la resistència a enzalutamida. En resum, aquesta classificació pot millorar la precisió en la predicció de progressió clínica i permet estratificar el tractament en estadis inicials i avançats de la malaltia.

El CaP és, per tant, una malaltia biològicament heterogènia amb alteracions moleculars variables subjacents a la iniciació del càncer i la seva progressió. Per aquest motiu, són necessaris nous mètodes per classificar el CaP, per millorar la predicció del pronòstic i seleccionar el tractament més adequat. En aquest sentit, en els últims anys s'han introduït nous biomarcadors per al maneig del CaP, amb l'objectiu de diferenciar CaP agressiu i CaP insignificant. En parlarem amb més detall en els capítols posteriors. Així, per exemple, l'índex 4K identifica amb gran precisió el risc d'un pacient individual de patir CaP agressiu. Per altra banda, alts valors de PHI estan associats amb l'agressivitat del tumor. A més, segons la bibliografia disponible, ambdós tests superen l'especificitat del PSA total i del percentatge de fPSA (%fPSA). Així mateix, malgrat que el valor discriminant més adequat per a l'índex de *PCA3* encara s'ha d'establir, el seu rendiment diagnòstic també supera el del PSA i el del %fPSA, encara que la seva relació amb l'agressivitat del tumor és objecte de controvèrsia. Finalment, són necessaris més estudis per identificar la utilitat dels biomarcadors basats en tècniques moleculars, com són els microARNs exosomals i no exosomals. També és necessària l'estandardització dels mètodes per tal d'avaluar amb més precisió aquests nous biomarcadors moleculars.

2. L'ANTIGEN ESPECÍFIC PROSTÀTIC (PSA)

2.1 Característiques generals

El PSA és una glicoproteïna serín-proteasa d'aproximadament uns 33.000 daltons que forma part de la família de les cal·licreïnes que també, a més a més del PSA, inclou la hK2, també proposada com a marcador tumoral per al CaP. El gen responsable de la síntesi del PSA, anomenat *KLK3*, està localitzat en el cromosoma 19 (19q13). El PSA fou identificat l'any 1979 per Wang et al. (25), si bé anteriorment altres grups havien identificat diverses substàncies, anomenades gamma seminoproteïna, p30 i E1, que actualment són reconegudes com una mateixa substància (26). La determinació de la concentració de PSA en sèrum s'utilitza en el diagnòstic, pronòstic i seguiment del CaP.

El PSA és produït per part de les cèl·lules epitelials de la pròstata a través d'un procés afavorit per l'acció dels andrògens. La seva funció primordial és promoure la líquefacció del coàgul seminal després de l'ejaculació. A causa de la seva activitat enzimàtica ha de circular en el plasma unit a diverses proteïnes inhibidores de les proteases, com són l'alfa-1-antitripsina i l'alfa-2-macroglobulina. Tan sols un petit percentatge del PSA, prèviament inactivat, circula en el plasma en forma de fPSA.

El PSA fou descrit inicialment com un antigen expressat específicament per part de les cèl·lules epitelials de la pròstata, però més endavant es va observar que també podia ser produït tant per les glàndules periuretrals i perirectals com per molts altres teixits (27). Yu i Diamandis van posar de manifest la presència de PSA tant en diversos tipus de tumor -com en el càncer de mama, en el qual la seva expressió és un signe de bon pronòstic-, com en diferents líquids biològics (secrecions mamàries, líquid amniòtic o els rentats broncoalveolars) (28-30).

INTRODUCCIÓ

Myrtle et al. (31) l'any 1986 van ser els primers a proposar la coneguda concentració de 4 µg/L com a valor discriminant del PSA, emprant l'assaig Tandem-R d'Hybritech. L'estudi, però, contenia alguns errors metodològics, ja que mesurava la concentració de PSA en una població de 860 homes aparentment sans, en els quals no s'havia descartat per cap procediment la presència de malaltia prostàtica. Tot i això, aquest valor discriminant fou posteriorment ratificat per Catalana et al. (32) en un estudi multicèntric realitzat en 6 centres universitaris i que va incloure 6.630 homes majors de 50 anys, als quals, a més a més de la mesura de PSA en sèrum, se'ls va realitzar un tacte rectal.

L'any 1999 l'Organització Mundial de la Salut (OMS) va introduir l'estàndard 96/670 com a material de referència certificat per a la mesura de la concentració de PSA, cosa que ha permès disminuir les diferències en funció de l'assaig utilitzat. Progressivament, els diversos fabricants han anat substituint el seu propi calibrador per calibradors traçables al material de referència de l'OMS. Malgrat tot, persisteixen certes diferències entre els diferents assaigs tot i l'ús de l'estàndard 96/670 (33). Un cas particular és el de Beckman Coulter que per mesurar la concentració de PSA en la seva plataforma Access® ofereix, juntament amb el calibrador preparat a partir del material de referència 96/670 de l'OMS, l'antic calibrador d'Hybritech, al qual, de fet, estan referits els valors discriminants d'aquesta magnitud usats en la pràctica clínica. Beckman Coulter comunicà que un nou valor discriminant de 3,1 µg/L hauria de ser utilitzat en substitució del tradicional de 4 µg/L quan s'utilitza el calibrador de l'OMS (34). Aquests resultats han estat corroborats per Jansen et al. (35) mitjançant un estudi on subratllen que els valors de 3 µg/L i 4 µg/L usats freqüentment per indicar la realització d'una biòpsia, haurien de ser substituïts per 2,4 µg/L i 3,2 µg/L, respectivament, quan el reactiu de Beckman Coulter es calibra amb l'estàndard de l'OMS.

La *Food and Drug Administration* (FDA) va aprovar l'any 1994 l'ús del PSA en el diagnòstic precoç del CaP i va establir la concentració de 4 µg/L com a valor discriminant per recomanar la biòpsia de la pròstata. Malgrat tot, una concentració de PSA inferior a 4 µg/L no exclou l'existència d'un CaP. Catalana et al. (36) informaren que el 22% dels pacients amb PSA entre 2,6 i 4 µg/L tenen un CaP. Així mateix, la *European Urological Association* quantifica la presència de CaP en pacients amb PSA inferior a 4 µg/L en un percentatge que va des del 6,6% quan el PSA és menor a 0,5 µg/L i del 26,9% quan el PSA està entre 3,1 i 4 µg/L (37). La introducció de l'estandardització promoguda per l'OMS requereix que calgui ajustar

convenientment per a cada assaig els diferents valors discriminants indicats en aquest apartat i que són referits al tradicional estàndard d'Hybritech.

La biòpsia de pròstata i, en menor mesura, el tacte rectal poden causar l'elevació de la concentració de PSA. Per aquest motiu, es recomana esperar 6 setmanes entre la biòpsia de la pròstata i l'extracció de sang i 3 dies entre la realització d'un massatge prostàtic i la corresponent extracció. En canvi, el tacte rectal, segons indica la majoria dels estudis, causa únicament una elevació lleugera i transitòria de la concentració de PSA. Malgrat això, és aconsellable realitzar l'extracció de sang prèviament a la realització d'un tacte rectal. Igualment, encara que els resultats publicats no són concloents, hi ha autors que aconsellen un període d'abstinència sexual de 48 hores previ a l'extracció per mesurar aquesta magnitud, cosa que pot ser particularment útil en cas de dubtes sobre la necessitat o no de practicar una biòpsia en un pacient concret (38-39). D'altra banda, els tractaments amb efecte antiandrogènic disminueixen la concentració de PSA a causa de la pèrdua de l'estímul que tenen els andrògens sobre la seva producció. Els fàrmacs inhibidors de la 5-alfa-reductasa, els quals impedeixen la conversió de la testosterona en dihidrotestosterona, disminueixen la concentració de PSA al voltant d'un 50% (40).

2.2 Ús del PSA en el cribratge del càncer de pròstata

Actualment, no hi ha unanimitat entre els experts sobre si el PSA és útil en el cribratge del CaP. Certament, des de la introducció de la mesura del PSA, els malalts són diagnosticats amb més freqüència quan la malaltia està clínicament localitzada. Així mateix, com indica l'*American Cancer Society*, s'ha observat que la supervivència als 5 anys ha augmentat des del 76% en els anys 1984-86, corresponents encara a l'era pre-PSA, fins al 99% en els anys 1999-2006 (41).

Les dades preliminars publicades el 2009 a *New England Journal of Medicine*, dels estudis europeu (*European Randomized Study of Prostate Cancer*, ERSPC) i nord-americà (*Prostate, Lung, Colorectal and Ovary screening trial*, PLCO) sobre la validesa del PSA en el cribratge del CaP ofereixen resultats discordants. Així, mentre l'estudi europeu mostra una disminució del 20% en la mortalitat del CaP quan es realitza el cribratge (42), l'estudi nord-americà indica que la realització del cribratge no ofereix cap benefici (43). Els resultats oposats de tots dos estudis podrien ser explicats en relació a certes diferències en el seu disseny. Així, l'estudi europeu

utilitza un valor discriminant de PSA de 3 µg/L, mentre que l'estudi nord-americà considera la concentració de 4 µg/L. Addicionalment, la contaminació amb mesures de PSA en la branca control és superior en l'estudi nord-americà que en l'europeu, fet que posaria en qüestió les conclusions obtingudes per part del PLCO.

Aquestes diferències han justificat un editorial que dos membres de l'estudi europeu han signat a *European Urology* per defensar la pràctica del cribratge en atenció a les dades de l'ERSPC (44). Malgrat tot, una revisió publicada l'any 2011 a *Annals of Internal Medicine* (45) subratllava que el cribratge del CaP amb PSA ofereix una reducció en la mortalitat per CaP escassa o nul·la, mentre que, per altra banda, està associat a perjudicis relacionats amb el tractament que, en alguns casos, pot ser innecessari. El 2012 es publicaven resultats actualitzats dels estudis europeu (46) i nord-americà (47) que ratificaven amb un major seguiment els resultats prèviament publicats. I l'any 2014 el grup europeu publicava nous resultats a *Lancet* (48), confirmant la reducció en la mortalitat en els pacients sotmesos a cribratge amb PSA i subratllant el fet que el percentatge de pacients que són diagnosticats amb metàstasis o PSA > 100 µg/L era superior en el grup control que en el grup sotmès a cribratge (9,6% vs 3,4%).

2.3 Estratègies per millorar l'especificitat del PSA

La prostatitis aguda i la HBP són les principals causes de falsos positius de PSA (49). En els malalts amb prostatitis aguda es poden observar concentracions molt elevades de PSA que disminueixen un cop resolta la malaltia al cap d'unes 6-8 setmanes. Per altra banda, entre el 25 i el 50% dels malalts amb HBP tenen una concentració de PSA en sèrum superior a 4 µg/L. També s'han observat elevacions de PSA en malalts amb pancreatitis aguda, càncer de pàncrees i xoc cardiogènic, mentre que no hi ha unanimitat sobre els efectes de les membranes d'hemodiàlisi en la concentració en sèrum de PSA, encara que s'ha descrit la seva elevació amb l'ús de membranes de baix flux (50).

L'elevat nombre de falsos positius de PSA en malalts amb HBP ha impulsat el disseny de diferents estratègies encaminades a millorar l'especificitat d'aquest marcador tumoral per tal d'evitar biòpsies innecessàries. L'any 1992, Carter et al. (51) descrivien la utilitat de la velocitat de PSA en el diagnòstic del CaP i suggerien que un augment anual superior a 0,75 µg/L seria indicatiu de la presència d'un tumor. Altres autors, en base a l'augment fisiològic del volum

de la pròstata en relació a l'edat, han proposat la utilització d'un valor discriminant de PSA ajustat a l'edat del pacient (52) que aniria dels 2,5 µg/L per homes amb una edat d'entre 40 i 49 anys i els 6,5 µg/L per homes amb una edat compresa entre els 70 i 79 anys. No obstant, aquesta opció tindria l'inconvenient de disminuir la sensibilitat per diagnosticar tumors d'alt grau en homes grans, mentre que, per altra banda, podria augmentar el sobrediagnòstic en homes joves (53).

D'altra banda, la PSAD -que consisteix en el càlcul del quocient entre la concentració de PSA en sèrum i el volum de la pròstata determinat per ecografia transrectal- podria resultar un test útil per disminuir el nombre de falsos positius de PSA (54). En general, s'estima que un valor de PSAD superior a 0,15 µg/L per gram de teixit és suggestiu de càncer, encara que aquest valor varia segons el procediment utilitzat per mesurar el PSA.

La utilitat del %fPSA en la detecció del CaP s'ha descrit en diversos estudis (6, 55). El %fPSA és menor en els malalts amb CaP que en els subjectes sans o en els malalts amb HBP (56-58). Aquest test té un particular interès a l'hora de decidir la necessitat d'efectuar una biòpsia en la zona grisa de PSA, definida per concentracions en sèrum d'aquest marcador tumoral entre 4 i 10 µg/L. Tanmateix, també s'han posat de manifest les limitacions del %fPSA. Així, una metaanàlisi publicada el 2006 subratllava que el percentatge de fPSA només proporciona informació addicional quan els seus nivells assoleixen valors extrems (59).

D'altra banda, l'ús del *complexed* PSA (concentració de PSA unit a proteïnes) s'ha proposat com una alternativa al PSA total i al %fPSA en el diagnòstic precoç del CaP, tot i que sense resultats concloents (60).

Més recentment, diversos estudis han demostrat que els polimorfismes de nucleòtid únic (SNPs) en el gen *KLK3* o altres gens relacionats poden influir en la concentració sèrica de PSA. Gudmundsson et al. (61) van detectar una associació significativa entre la concentració sèrica de PSA i SNPs en sis loci, trobant l'associació més forta per als SNPs situats a prop o en el gen *KLK3*. A més, alguns d'aquests SNPs podrien estar associats amb la predisposició al CaP i amb l'agressivitat d'aquest (62). L'efecte genètic sobre l'expressió del PSA suggereix que una correcció genètica de la concentració sèrica de PSA permetria millorar l'especificitat del test. Es podrien evitar biòpsies innecessàries en els pacients productors de PSA, mentre que s'evitarien biòpsies negatives en els pacients que genèticament són poc productors de PSA. Helfand et al. (63) han suggerit una interpretació genèticament personalitzada de la concentració sèrica de PSA per tal d'obtenir resultats més precisos. Segons aquests autors, la

correcció genètica de la concentració sèrica de PSA podria reduir el nombre de biòpsies potencialment innecessàries, millorant l'ús del PSA com a eina de cribratge.

D'altra banda, per tal d'augmentar l'especificitat del PSA i predir la probabilitat d'una biòpsia de pròstata positiva amb precisió, s'han desenvolupat models estadístics que combinen PSA i altres variables (edat, tacte rectal, fPSA, volum prostàtic...), com són els nomogrames, les xarxes neuronals artificials (ANN, *artificial neural network*), les anàlisis d'arbres de regressió o els sistemes de classificació per grups de risc. En estudis comparatius, es va suggerir que de les eines de predicció disponibles fins al moment, els nomogrames són els que tenen la precisió més alta i les millors característiques discriminants per a la predicció de resultats en pacients amb CaP. Un nomograma és una representació gràfica d'una fórmula matemàtica o algoritme que incorpora diverses variables contínues per predir un resultat específic basat en mètodes estadístics com la regressió logística o l'anàlisi de riscos proporcionals Cox (64,65). Els nomogrames que poden predir la probabilitat de CaP en la biòpsia es basen freqüentment en les següents variables: els antecedents familiars, l'edat, el tacte rectal, les troballes de l'ecografia transrectal i la concentració sèrica de PSA en sèrum. Carlson et al. (66) desenvoluparen l'any 1998 un dels primers models de predicció del resultat de la biòpsia basat en una regressió logística i en el qual les variables d'entrada eren l'edat del pacient, el PSA total i el fPSA. Dels 3773 pacients inclosos (amb PSA entre 4 i 20 µg/L), 1234 tenien un càncer, mentre que en 2539 pacients la biòpsia fou negativa. La validació es féu en 525 pacients, observant que amb una sensibilitat del 95%, el valor discriminant calculat del 18% per la RL tenia una especificitat del 34%. Entre els nomogrames més utilitzats hi ha el *Prostate Risk Indicator* de l'ERSPC (SWOP-PRI; www.prostatecancer-riskcalculator.com), el calculador de risc de CaP del *North American Prostate Cancer Prevention Trial* (PCPT-CRC; <http://deb.uthscsa.edu/URORiskCalc/Pages/calcs.jsp>), i el desenvolupat per Karakiewicz et al. (Universitat de Montreal). Tots ells han estat objecte de validació interna i externa, amb l'obtenció de les següents AUCs en la validació externa: SWOP-PRI: 0,68; PCPT-CRC: 0,72; Montreal: 0,79 (67-69).

3. NOUS BIOMARCADORS EMERGENTS PER AL DIAGNÒSTIC I PRONÒSTIC DEL CÀNCER DE PRÒSTATA

3.1 Prostate Cancer Gene 3 (*PCA3*)

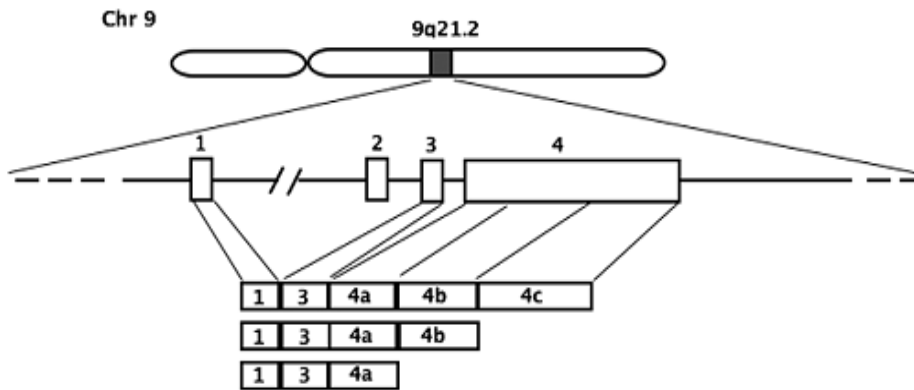
3.1.1 Biologia de *PCA3*

El gen *PCA3* - prèviament anomenat *DD3* (*differential display clone 3*)- va ser descobert l'any 1999 per Bussemakers et al. (70) com un gen sobreexpressat entre 10 i 100 vegades en el CaP. L'expressió de l'ARN missatger (ARNm) de *PCA3* està restringida a la pròstata i no s'expressa en cap altre teixit normal de l'organisme ni cap altre tumor (71,72). Bussemakers et al. van descobrir el gen *PCA3* mitjançant una tècnica anomenada *differential display analysis*, amb què van comparar perfils d'expressió d'ARNm del tumor i de teixit no neoplàsic adjacent en teixits de prostatectomia radical. No es veié expressió en altres teixits normals humans, ni en tumors de mama, cèrvix, endometri, ovari, testicle, bufeta de l'orina o ronyó. A través de l'anàlisi per *Northern Blot*, el gen es trobà altament sobreexpressat en tumors de pròstata comparats amb teixit prostàtic sa del mateix pacient.

Aquest gen està localitzat en el cromosoma 9q21-22 i conté 4 exons i 3 introns. El transcrit més comú està format pels exons 1, 3, 4a i 4b (Figura 1), encara que l'exó 2 ha estat descrit com a específicament amplificat en mostres de CaP, però no en teixit hipertròfic (73).

Des del seu descobriment, l'estructura del gen *PCA3* ha estat àmpliament investigada i recentment s'han descrit quatre nous llocs d'inici de la transcripció així com un *splicing* alternatiu a l'exó 2 i 4 llocs de poliadenilació addicional (73). Els exons contenen múltiples codons *stop* i el marc de lectura és curt, per tant el gen no codifica per cap proteïna i transcriu un ARN no codificant (*non-coding RNA*). Ferreira et al. (74) van trobar que el silenciament de *PCA3* amb ARNs silenciadors (siARN) disminueix el creixement cel·lular i induïx la mort cel·lular per apoptosi, cosa que suggereix la relació entre *PCA3* i l'agressivitat del tumor.

Figura 1. Estructura del gen *PCA3*. *PCA3* consta de 4 exons. El transcrit més freqüent conté els exons 1, 3, 4a i 4b. L'exó 2 només està present en el 5% dels transcrits, però s'ha descrit específicament amplificat en mostres amb CaP.



3.1.2 Utilitat diagnòstica de *PCA3*

El gen *PCA3* es troba altament sobreexpressat en el 95% dels tumors comparat amb teixit prostàtic normal o amb HBP, fet que suggeria la seva utilitat en la detecció del CaP. Anys després de la identificació del gen *PCA3*, es desenvolupà un assaig per detectar l'ARNm de *PCA3* en orina (71). La seva quantificació en orina podria permetre reduir el nombre de biòpsies negatives i per tant augmentar l'especificitat dels actuals algorismes diagnòstics del CaP.

L'anàlisi del gen *PCA3* es realitza mitjançant la determinació de l'ARNm del gen *PCA3* en orina obtinguda després d'un massatge de pròstata, el qual es realitza per alliberar cèl·lules de la pròstata en el tracte urinari. La mesura de l'ARNm de *PCA3* s'ha de fer simultàniament amb la de l'ARNm del gen del PSA (*KLK3*), per tal de normalitzar la quantitat d'ARNm de *PCA3* en les mostres estudiades, ja que *KLK3* no se sobreexpressa en el CaP.

Els primers treballs publicats que avaluaven el rendiment diagnòstic de *PCA3* en la detecció del CaP utilitzaven la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) quantitativa en temps real (qRT-PCR) (71,75,76). Groskopf et al. (77) l'any 2006 introduïren una nova prova que incloïa l'aïllament, amplificació i quantificació de l'ARNm de *PCA3* i *KLK3* utilitzant el sistema de Gen-Probe GTS400. Aquest test va obtenir la *Conformité européenne* (CE) el novembre de 2006 i fou aprovat per la FDA el 2012 per decidir la repetició de la biòpsia de

pròstata en homes majors de 50 anys d'edat amb una o més biòpsies prèvies negatives. La guia clínica 2015 de la *National Comprehensive Cancer Network* per a la detecció precoç del CaP (78) considera l'índex de PCA3 un test útil per decidir la repetició de la biòpsia en pacients amb una biòpsia prèvia negativa, suggerint l'ús del valor discriminant de 35. La companyia Gen-Probe va promoure l'automatització i l'estandardització d'aquest test, de manera que el nombre d'estudis augmentà ràpidament. La metanàlisi publicada el 2010 per Ruiz-Aragón i Márquez-Peláez (79), basada en 14 estudis de moderada a alta qualitat, va concloure que la determinació de l'índex de PCA3 en l'orina és útil en la detecció de CaP. D'acord amb aquesta metanàlisi, la sensibilitat va oscil·lar des del 46,9% al 82,3%, l'especificitat va variar del 56,3% al 89%, el valor predictiu positiu del 39% al 75,8%, i el valor predictiu negatiu del 61,4% al 89,7%.

La revisió comparativa publicada per Bradley et al. (80) identifica 34 estudis observacionals i conclou que el rendiment diagnòstic de l'índex de PCA3 és superior que el del PSA total, però també assenyalava que l'evidència no és suficient per concloure que la determinació de l'índex de PCA3 permeti obtenir resultats globals millors. La sensibilitat de l'índex de PCA3 en aquest estudi va ser de 94,3% per al valor discriminant de 10%, 61,1% per al valor discriminant de 35%, amb un percentatge de càncers deixats de diagnosticar del 6% i el 39%, respectivament. El percentatge de biòpsies estalviades va ser del 22% i del 70%, respectivament.

Els resultats de dues metanàlisis recents publicades per Luo et al. (81,82) són consistents amb les dades publicades anteriorment, destacant que el PCA3 pot ser utilitzat per al diagnòstic precoç del CaP amb l'objectiu d'evitar biòpsies innecessàries, tot i que també se subratlla l'heterogeneïtat dels estudis publicats. Luo et al. (81) van trobar una sensibilitat d'entre el 46,9% i el 82,3%; l'especificitat era del 55% al 92%; el valor predictiu positiu tenia un rang entre el 39% i el 86%; i el valor predictiu negatiu va ser del 61% al 89,7%.

En resum, els resultats disponibles (71,75-77, 79, 81-96) suggereixen que l'índex de PCA3 és útil en la detecció precoç del CaP, especialment per pacients amb biòpsia prèvia negativa (taula 2). No obstant això, un dels assumptes més controvertits pel que fa a l'índex de PCA3 es refereix a la definició del valor discriminant utilitzat per detectar CaP amb una sensibilitat i especificitat apropiada. Haese et al. (83) en un estudi amb 463 homes programats per repetir biòpsia, indicaren que un índex de PCA3 de 35 proporcionava el balanç òptim entre la sensibilitat (47%) i l'especificitat (72%), malgrat que un 21% dels tumors d'alt grau es

deixaven sense diagnosticar. S'han reportat resultats similars recentment en una metaanàlisi publicada per Hu et al. (97) incloent 16 estudis que utilitzaren 35 com el valor discriminant per decidir quan fer una biòpsia. Aquests autors van documentar una sensibilitat global del 57% i una especificitat global del 71%.

El nombre de càncers deixats de diagnosticar es podria reduir amb l'ús de valors discriminants inferiors. Crawford et al. (84) mostraren una reducció dels càncers deixats de diagnosticar d'un 21,6% a un 5,6% quan el valor discriminant es canviava de 35 a 10. La FDA, per la seva banda, ha recomanat l'ús d'un valor discriminant de 25 per al test de PCA3 de ProgenSA™ per indicar la repetició de biòpsia, tot i que el valor discriminant més àmpliament utilitzat és 35, tal com Ruiz-Aragón i Márquez-Peláez van explicar en la seva metaanàlisi (79).

D'altra banda, un índex de PCA3 elevat, fins i tot superior a 100, no assegura l'existència d'un tumor. Segons Haese et al. (83), la taxa de detecció de CaP va ser només del 47% en pacients amb índex de PCA3 superior a 100. Aquest és un punt que no està clar a causa de l'especificitat tissular de *PCA3* i l'expressió diferencial d'aquest biomarcador en cèl·lules normals i de la pròstata cancerosa. Un índex elevat de PCA3 en pacients sense CaP podrien explicar-se per l'existència de tumors que no són diagnosticats en la biòpsia. En aquest sentit, Roobol et al. (98) indicaren que després d'un període de seguiment de 19 mesos, el percentatge de CaP detectat va ser més gran en pacients amb índex de PCA3 ≥ 100 (30% vs 18,8%). No obstant això, els autors van concloure que els resultats no ofereixen una explicació directa de per què l'índex de PCA3 pot estar excessivament elevat malgrat l'absència de CaP detectable a la biòpsia (98, 99).

3.1.3 Relació de l'índex de PCA3 amb l'agressivitat del CaP

La relació entre l'índex de PCA3 i l'agressivitat del CaP és també objecte de controvèrsia. Hi ha estudis que suggereixen aquesta relació (85-87), mentre que altres conclouen que no hi ha cap relació entre l'índex de PCA3 i el grau de Gleason o l'estadi clínic o patològic (88-90). Així per exemple, Merola et al. (100) en un grup de 114 pacients amb CaP observaren una associació significativa entre l'índex de PCA3 i el grau de Gleason ($p=0.02$). Igualment, un estudi recent realitzat en una cohort de 3073 homes, incloent 1341 homes amb CaP, va

arribar a la conclusió que l'índex de PCA3 estava significativament associat amb el grau de Gleason de la biòpsia (91), tot i que l'anàlisi de corbes ROC va mostrar que l'índex de PCA3 no superava significativament al PSA en la predicció de CaP d'alt grau (AUC: 0,682 vs 0,679, respectivament, $p = 0,702$). Wei et al. (92) conclogueren que l'índex de PCA3 podria ser suggerit com un factor pronòstic útil en un estudi realitzat el 2015 en 207 pacients sotmesos a biòpsia prostàtica. En aquest estudi es trobà que un índex elevat de PCA3 en orina estava estretament correlacionat amb indicadors de mal pronòstic, incloent un grau de Gleason alt, un percentatge elevat de cilindres afectats per CaP en la biòpsia, o un estadi clínic avançat.

Per altra part, de la Taille et al. (101) van mostrar en un estudi prospectiu multicèntric que en els homes amb CaP localment avançat o metastàtic, un índex de PCA3 ≥ 35 en el moment d'iniciar la teràpia de deprivació androgènica predeia un risc més baix de desenvolupar CaP resistent a la castració (CRPC) en els següents 3 anys.

Contràriament, Hessels et al. (88) no trobaren una associació significativa entre l'índex de PCA3 i el grau de Gleason de la biòpsia i l'estadi clínic en una cohort de 336 pacients amb CaP sotmesos a biòpsia. Tampoc es trobà correlació amb el volum tumoral, el grau de Gleason de la peça quirúrgica ni amb l'estadi patològic en una subcohort de 70 pacients sotmesos a prostatectomia radical. Vlaeminck-Guillem et al. (102) avaluaren l'índex de PCA3 per predir el resultat de la biòpsia de pròstata en 1015 pacients. En aquest estudi, l'índex de PCA3 no correlacionava amb el grau de Gleason, però sí amb el volum del tumor.

D'altra banda, Wei et al. (103) suggeriren que, en el grup de pacients programats per repetició de biòpsia de pròstata, amb un valor discriminant de 20 de l'índex de PCA3, s'estalviarien el 46% de les biòpsies, però es deixaria de diagnosticar el 3% de CaP d'alt grau. No obstant, en el cas dels pacients que s'anaven a sotmetre a biòpsia inicial amb el mateix valor discriminant, es deixaria de diagnosticar el 13% de CaP d'alt grau. Això suggereix que un valor discriminant més baix de l'índex de PCA3 o altres biomarcadors addicionals són necessaris per descartar la realització d'una primera biòpsia.

De la mateixa manera, PCA3 fallà en la predicció dels càncers d'alt grau en la biòpsia inicial amb grau de sospita de CaP elevat en ressonància magnètica (96). Aquests estudis subratllen les limitacions de la utilització de PCA3 en orina com un biomarcador de diagnòstic i suggereixen que alguns pacients amb un índex de PCA3 baix poden tenir un CaP agressiu en la biòpsia inicial.

INTRODUCCIÓ

De moment no existeix una explicació clara per aquestes discordances. Tot i així, Auپرچ et al. (104) intentaren aclarir per què els tumors avançats no donen sempre un resultat elevat de l'índex PCA3. D'acord amb aquests autors, els tumors indiferenciats perdrien la seva diferenciació glandular, fet pel qual *PCA3* difícilment passa a l'orina. Per tant, l'índex de PCA3 mesurat en l'orina podria ser baix, tot i ser un tumor avançat.

Aquesta falta d'unanimitat suggereix la necessitat de realitzar més estudis per tal de comprendre millor els mecanismes biològics de *PCA3*, i confirmar la seva utilitat per a la selecció de pacients amb tumors insignificants que podrien beneficiar-se de la vigilància activa.

Taula 2. Rendiment diagnòstic de l'índex de PCA3 en la detecció precoç del CaP. CaP: càncer de pròstata; AUC: àrea sota la corba; TR: tacte rectal; PR: prostatectomia radical; VA: vigilància activa; MRF-TB: biòpsia dirigida per fusió d'imatges de ressonància magnètica; TBx: biòpsia prostàtica dirigida per software de fusió d'imatges/ultrasonografia.

Autor	Cohort	AUC	Relació amb agressivitat
Hessels et al, Eur Urol, 2003 (71)	108 pacients consecutius admesos per biòpsia prostàtica per PSA >3 µg/L	0,72	No reportada
Fradet et al, Urology, 2004 (75)	517 homes que s'anaven a sotmetre a biòpsia transrectal guiada per ecografia a 5 centres mèdics	0,86	No reportada
Tinzl et al, Eur Urol, 2004 (76)	Estudi prospectiu que inclou 201 pacients amb concentracions elevades de PSA en sèrum i/o TR anòmal referits per a biòpsia prostàtica	0,87	No reportada
Groskopf et al, Clin Chem, 2006 (77)	3 grups: homes programats per biòpsia prostàtica (n=70), homes sans (<45 anys sense factors de risc de CaP coneguts; n=52), homes sotmesos a PR (n=21)	0,746	No reportada
Ruiz-Aragón and Márquez-Peláez, Actas Urol Esp, 2010 (79)	Metanàlisi	0,63-0,87	No reportada
Luo et al, Chin Med J, 2014 (81)	Metanàlisi	0,63-0,87	No reportada
Luo et al, Asian J Androl, 2014 (82)	Metanàlisi	0,577 – 0,730	No reportada
Haese et al, Eur Urol, 2008 (83)	Estudi de cohorts prospectives de 463 pacients amb una o dues biòpsies negatives	0,658	Sí, amb grau de Gleason i estadi clínic
Crawford et al, J Urol, 2012 (84)	Estudi prospectiu i multicèntric de 1962 homes amb PSA > 2,5 µg/L i/o TR anòmal	0,706	Sí, amb grau de Gleason
Capoluongo et al, Clin Chim Acta, 2014 (85)	734 pacients sotmesos a primera biòpsia prostàtica per sospita de CaP	0,775	No correlació amb grau de Gleason

Taula 2 (continuació)

Autor	Cohort	AUC	Relació amb agressivitat
Van Poppel et al, BJU Int, 2012 (86)	Anàlisi agrupada (n=1009; 173 tractats amb PR) de dades de dos assaigs prospectius multicèntrics europeus que avaluaven pacients a la biòpsia inicial o repetida	No reportada	Sí, amb el grau de Gleason de la biòpsia i de la peça
Durand et al, BJU Int, 2012 (87)	Estudi prospectiu i multicèntric que inclou 160 pacients amb CaP localitzat	No reportada	Sí, amb el grau de Gleason de la biòpsia i de la peça, i amb l'estadi patològic
Hessels et al, Prostate, 2010 (88)	351 homes admesos per biòpsia per PSA >3 µg/L, i TR anòmal	No reportada	No correlació amb estadi clínic ni patològic ni amb grau de Gleason de la biòpsia ni de la peça.
Ploussard et al, Eur Urol, 2011 (89)	106 pacients consecutius amb CaP de baix risc sotmesos a PR	No reportada	Útil per seleccionar pacients per VA. No correlació amb mal pronòstic (pT3 i/o patró primari de Gleason 4)
Van Gils et al, Prostate, 2008 (90)	62 pacients amb CaP sotmesos a PR	No reportada	No correlació amb grau de Gleason de la peça ni estadi patològic

Taula 2 (continuació)

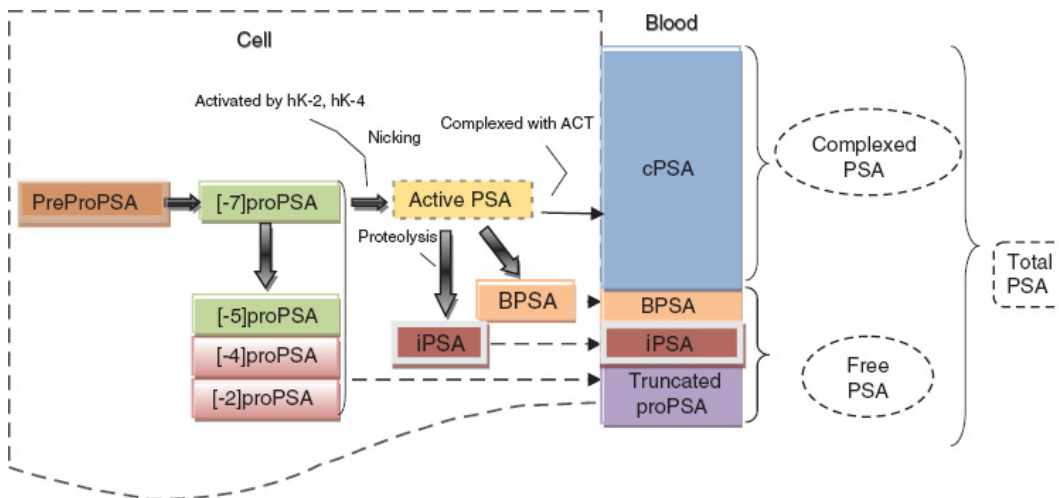
Autor	Cohort	AUC	Relació amb agressivitat
Chevli et al, J Urol, 2014 (91)	Estudi retrospectiu amb 3073 homes sotmesos a biòpsia inicial	0,697	No correlació amb grau de Gleason
Wei et al, Int J Clin Exp Med 2015 (92)	207 pacients amb sospita de CaP reclutats entre 2012 i 2014	No reportada	Sí, amb el grau de Gleason de la biòpsia, el percentatge de cilindres positius i amb l'estadi clínic
Rubio-Briones et al, BMC Cancer, 2015 (93)	401 pacients seleccionats per biòpsia inicial i per validar un nomograma	0,701	Sí, amb el grau de Gleason de la biòpsia
De Luca et al, BJU Int, 2016 (94)	282 pacients amb concentracions elevades de PSA en sèrum i/o TR anòmal sotmesos a TBx després de biòpsia estàndard negativa	No reportada	Sí, amb el grau de Gleason de la biòpsia
Cui et al, Sci Rep. 2016 (95)	Metanàlisi	0,57-0,85	No reportada
Fenstermaker et al, Urology, 2017 (96)	187 homes reclutats entre 2012 i 2014 sotmesos a MRF-TB inicial	0,67	No reportada

3.2. [-2]proPSA i prostate health index (PHI)

3.2.1. Isoformes de PSA lliure. Definició de PHI

La descripció de diverses isoformes de fPSA (BPSA: *benign PSA*; iPSA: *intact PSA*; proPSA) ha introduït una millora en la detecció del CaP (105, 106). De les tres isoformes, particularment proPSA s'associa amb la presència de CaP. La forma nativa del proPSA és [-7] proPSA, que conté a l'extrem N-terminal un pèptid prolíder de 7 aminoàcids. A través de l'escissió proteolítica d'aquest pèptid, mediada per les cal·licreïnes hK2 i hK4, es formen les altres fraccions de proPSA conegudes com [-2], [-4] i [-5] proPSA (Figura 2).

Figura 2. Formes moleculars del PSA. BPSA: benign PSA; iPSA: intact PSA; cPSA: complexed PSA; ACT: Alpha 1-antichymotrypsin.



Per tal d'augmentar l'especificitat del PSA total s'ha proposat un assaig per mesurar [-2] proPSA, la isoforma més estable de proPSA. Diversos estudis (107-119) han suggerit el valor clínic de dos tests derivats de [-2] proPSA (taula 3). Per una banda, el percentatge de [-2] proPSA en relació a fPSA (%[-2] proPSA), i d'altra banda, PHI, que combina la concentració de [-2] proPSA, fPSA, i PSA total segons la fórmula $([-2] \text{ proPSA}/\text{fPSA}) \cdot \sqrt{\text{tPSA}}$. Aquest índex, que el 2012 va rebre l'aprovació de la FDA, estaria indicat en homes majors de 50

anys, amb una concentració sèrica de PSA entre 4 i 10 µg/L i tacte rectal negatiu, grup de pacients en el qual ajudaria a reduir el nombre de biòpsies negatives. Malgrat l'alt cost de la prova per a la determinació de [-2] proPSA, hi ha estudis que assenyalen que l'ús de PHI en la detecció del CaP disminuiria els costos globals (120).

3.2.2. Utilitat diagnòstica de [-2]proPSA i PHI

En el curs dels darrers anys, s'ha suggerit que [-2]proPSA i PHI podrien distingir el CaP de les malalties prostàtiques benignes millor que el PSA o el %fPSA. Una metaanàlisi publicada al 2013 (107) en relació a 12 articles rellevants que avaluaven aquests tests, revelà valors d'AUC d'entre 0,635 i 0,78 per %[-2] proPSA i d'entre 0,703 i 0,77 per PHI. Aquest rendiment diagnòstic va ser més gran que l'observat per a PSA total (AUCs entre 0,50 i 0,585) o per a %fPSA (AUCs entre 0,58 i 0,77). Una metanàlisi publicada al 2014 va obtenir conclusions similars (108), aportant una sensibilitat, especificitat, i AUC de 0,86, 0,40 i 0,72, respectivament, per %[-2] proPSA i de 0,85, 0,45 i 0,70, respectivament, per PHI. Una metaanàlisi posterior que comparava PHI i %fPSA en pacients amb concentracions de PSA total entre 2 i 10 µg/L (121), confirma que els resultats de PHI superen els de %fPSA, mostrant AUCs de 0,74 i 0,63 per PHI i %fPSA, respectivament.

Entre els articles publicats fins al moment, destaquen dos estudis multicèntrics que han avaluat la utilitat de PHI per la detecció de CaP en pacients amb PSA entre 2 i 10 µg/L. Així, Stephan et al. (109), en un estudi amb 1362 pacients, van mostrar valors d'AUC de 0,72 i 0,74 per %[-2] proPSA i PHI, respectivament. Per una altra banda, Lazzeri et al. (110) van publicar un estudi prospectiu europeu incloent 646 pacients amb valors d'AUC de 0,67 per ambdós biomarcadors.

Taula 3. Rendiment diagnòstic de PHI i %[-2]proPSA en la detecció del CaP. CaP: càncer de pròstata; AUC: àrea sota la corba; TR: tacte rectal; tPSA: PSA total.

Autors	Cohort	Biomarcador o model multivariat	AUC	Relació amb l'agressivitat
Filella et al, 2013 (107)	metaanàlisi	%[-2]proPSA	0,635-0,78	No disponible
		PHI	0,703-0,77	
		tPSA	0,50-0,585	
		%fPSA	0,58-0,77	
Wang et al, 2014 (108)	metaanàlisi	%[-2]proPSA	0,638-0,78	No disponible
		PHI	0,69-0,781	
		tPSA	0,50-0,60	
		%fPSA	0,52-0,77	
Stephan et al, 2013 (109)	1362 pacients de 4 estudis diferents amb PSA 1,6- 8,0 µg/L	%[-2]proPSA	0,72	Sí, amb el grau de Gleason
Lazzeri et al, 2013 (110)	Estudi de cohorts prospectiu de 646 pacients de 5 centres europeus amb PSA 2-10 µg/L	%[-2]proPSA	0,67	Sí, amb el grau de Gleason
		PHI	0,67	Gleason
Sokoll et al., 2010 (111)	Estudi multicèntric prospectiu amb 566 pacients sotmesos a biòpsia	Model multivariat (edat, raça, TR, història familiar de CaP + PSA + %fPSA + %[-2]proPSA), PSA 2-10 µg/L	0,76	Sí, amb el grau de Gleason
Stephan et al, 2009 (112)	586 pacients amb biòpsia prostàtica positiva o negativa	Model multivariat (edat, volum prostàtic, TR, PSA, %fPSA + PHI o %[-2]proPSA)	0,75	Sí, amb el grau de Gleason de la peça i l'estadi patològic
Guazzoni, 2011 (113)	Estudi de cohorts prospectiu de 268 pacients amb PSA 2-10 µg/L i TR negatiu	Model multivariat (edat, volum prostàtic, PSA, %fPSA + %[-2]proPSA)	0,82	Sí, amb el grau de Gleason
		Model multivariat (edat, volum prostàtic, PSA, %fPSA+ PHI)	0,83	

Taula 3 (continuació)

Autors	Cohort	Biomarcador o model multivariat	AUC	Relació amb l'agressivitat
Fossati et al, 2015 (114)	238 pacients menors de 60 anys del projecte PROMetheus	Model multivariat (edat, volum prostàtic, PSA, fPSA, %fPSA + PHI)	0,77	Sí, amb el grau de Gleason
Lughezzani et al, 2014 (115)	883 pacients programats per biòpsia de 5 centres europeus	Model multivariat (edat, volum prostàtic, TR, història de biòpsia +PHI)	0,80	No disponible
Abrate et al, 2015 (116)	Estudi de casos i controls amb 142 pacients obesos del projecte PROMetheus	Model multivariat (edat, volum prostàtic, PSA, fPSA, %fPSA + %[-2]proPSA)	0,886	Sí, amb el grau de Gleason
Nordström et al, 2015 (117)	531 pacients amb PSA 3–15 µg/L sotmesos a biòpsia inicial durant 2010–2012	PHI	0,704	Sí, amb el grau de Gleason
Lazerri et al, 2016 (118)	Estudi de casos i controls amb 262 pacients del projecte PROMetheus, sotmesos a biòpsia, PSA >10 µg/L	Model multivariat (edat, volum prostàtic, història de biòpsia +PHI)	0,835	Sí, amb el grau de Gleason
Tosoian et al, 2017 (119)	345 pacients, 135 dels quals sotmesos a biòpsia segons resultat de PHI	PHI	0,722	Sí, amb el grau de Gleason de la biòpsia i de la peça i amb l'estadi patològic

3.2.3. Relació de [-2]proPSA i PHI amb l'agressivitat del CaP

Els estudis publicats mostren que %[-2] proPSA i PHI estan relacionats amb l'agressivitat del CaP, amb resultats d'aquests tests més alts en pacients amb grau de Gleason ≥ 7 i en pacients amb tumors localment avançats (111-113, 122). Així, Loeb et al. (123) en un estudi amb 658 homes candidats a biòpsia amb valors de PSA entre 4 i 10 $\mu\text{g/L}$, van observar que l'AUC per identificar un CaP clínicament significatiu era de 0,698 per a PHI, mentre que per al %fPSA era només de 0,654. A més, Fossati et al. (114) indicaren que tant PHI com %[-2] proPSA predeien un estadi patològic T3 i un grau de Gleason ≥ 7 a la peça quirúrgica després de l'avaluació d'una sèrie de 489 pacients tractats amb prostatectomia radical. La disponibilitat de biomarcadors d'agressivitat és un punt rellevant ja que una proporció substancial de nous tumors diagnosticats són candidats a vigilància activa, per les seves característiques de CaP clínicament insignificant. Així, Tosoian et al. (124) suggereixen que PHI proporciona una millor predicció de la reclassificació de la biòpsia en el seguiment dels pacients en vigilància activa. Per una altra banda, de la Calle et al. (125) avaluaren la utilitat de PHI per discriminar el CaP agressiu (grau de Gleason ≥ 7) versus CaP indolent (grau de Gleason <7) o absència de CaP en dos cohorts independents de 561 i 395 pacients sotmesos a biòpsia inicial. L'AUC fou de 0,815 en la primera cohort per detectar càncer agressiu. Segons els autors, el valor discriminant òptim a una sensibilitat del 95% seria 24 i s'evitarien el 41% de biòpsies innecessàries. Aquests resultats es van confirmar a la cohort de validació. En aquest estudi, PHI detectà CaP agressiu amb major especificitat que PSA total i %fPSA.

3.2.4. Inclusió de [-2]proPSA i PHI en models multivariats

Mikolajczyk et al. (126) han suggerit la utilitat de la combinació de diversos biomarcadors en un model multivariat per a la detecció de CaP. La inclusió de %[-2] proPSA en un model multivariat fou suggerida inicialment per Sokoll et al. (111), obtenint una AUC de 0,76 per als pacients amb PSA total entre 2 i 10 $\mu\text{g/L}$. Aquest model incloïa PSA total, %fPSA i %[-

2] proPSA, juntament amb diversos factors clínics i demogràfics. Posteriorment, diversos estudis han avaluat la inclusió de %[-2] proPSA i PHI en un model multivariat per detectar CaP. Stephan et al. (109) milloraren el rendiment diagnòstic en la detecció de CaP afegint %[-2] proPSA o PHI (AUC de 0,75, en ambdós casos) a un model multivariat basat en l'edat del pacient, el volum prostàtic, tacte rectal, PSA total, %fPSA, el qual presentava una AUC de 0,69.

De manera semblant, un model multivariat descrit per Guazzoni et al. (113) mostrava un augment en el rendiment diagnòstic de 0,10 o 0,11, respectivament, quan %[-2] proPSA (AUC 0,82) o PHI (AUC 0,83) s'afegien a un model base que incloïa l'edat del pacient, el volum de la pròstata, PSA total, i el %fPSA (AUC 0,72).

D'altra banda, Lughezzani et al. (127) van desenvolupar un nomograma basat en PHI per ajudar a la decisió de realitzar una biòpsia. En incloure PHI en un model multivariat de regressió logística basat en l'edat del pacient, el volum de la pròstata, tacte rectal, i la història de biòpsia, el rendiment diagnòstic predictiu augmentà significativament de 0,73 a 0,80. Aquest nomograma fou validat externament per un estudi multicèntric europeu basat en 833 pacients, obtenint una AUC de 0,752 (115). Roobol et al. (128) van mostrar més recentment resultats anàlegs validant aquest nomograma en 1185 homes procedents de quatre centres europeus i obtenint una AUC de 0,75 per al CaP i de 0,69 per al CaP clínicament significat (estadi clínic superior a T2b i/o un grau de Gleason de la biòpsia Gleason ≥ 7). En aquest estudi es van trobar resultats similars mitjançant l'addició de PHI al calculador de risc de l'ERSPC, obtenint una eficàcia diagnòstica de 0,72 per a tots els CaP i 0,68 per al CaP clínicament significat. Malgrat aquests resultats positius, els autors van concloure que les possibles reduccions en la taxa de biòpsies innecessàries són limitades quan s'afegeix PHI als models. Més optimistes són les conclusions d'un estudi recent de cost-efectivitat de la detecció del CaP utilitzant PHI (129). Els autors van utilitzar un model de microsimulació basat en els resultats de l'assaig ERSPC per comparar els efectes de cribratge utilitzant PHI i els que utilitzen només PSA. El model prediu una reducció del 23% en les biòpsies negatives per als homes amb PSA entre 3 i 10 $\mu\text{g/L}$, arribant a la conclusió que PHI és un 11% més rendible que el cribratge basat només en el PSA.

3.3. Perfil de 4 cal·licreïnes. Índex 4K

El perfil de 4 cal·licreïnes valora la concentració de PSA total i fPSA conjuntament amb les concentracions d'iPSA (una fracció del fPSA) i de la hK2, una cal·licreïna amb una elevada homologia amb el PSA. L'índex 4K és un calculador del risc de detectar CaP a la biòpsia, basat en la mesura d'aquestes 4 cal·licreïnes juntament amb l'edat del pacient, el tacte rectal i l'existència d'una biòpsia prèvia negativa. El test ofereix informació del risc de tenir un CaP d'alt risc i per tant introdueix un canvi en la filosofia seguida fins al moment. L'objectiu ja no és indicar una biòpsia per diagnosticar CaP, sinó que es pretén detectar únicament tumors agressius, amb un grau de Gleason ≥ 7 (CaP d'alt grau). Tot i que l'índex 4K no té l'aprovació de la FDA, al juny de 2015, la *National Comprehensive Cancer Network* recomanà l'ús d'aquesta prova per a la detecció de CaP d'alt grau per als pacients que mai han estat sotmesos a biòpsia o després d'una biòpsia negativa (78).

L'assaig ha estat desenvolupat arran dels estudis realitzats pel grup liderat per Lilja i Vickers, del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, els quals van realitzar una extensa investigació en col·laboració amb diversos centres europeus, la majoria corresponents a l'ERSPC. Les AUCs pel perfil de 4 cal·licreïnes reportades en tots aquests estudis (130-136) (taula 4) són superiors a la d'un model basat en PSA tant per detectar qualsevol tipus de CaP com per detectar CaP d'alt grau. Les AUC per al perfil de 4 cal·licreïnes obtingudes en aquests estudis per a la detecció del CaP d'alt grau oscil·laren entre 0,793 i 0,870, mentre que per al model basat en PSA oscil·laren de 0,658 a 0,816. En comparar els corresponents models clínics per predir CaP d'alt grau es van observar diferències similars. Així, el rang d'AUCs per al model clínic que combinava PSA, edat del pacient i tacte rectal fou de 0,709 a 0,868, mentre que pel model basat en el perfil de 4 cal·licreïnes més tacte rectal les AUC oscil·laren de 0,798 a 0,903.

D'altra banda, malgrat que el volum prostàtic (calculat mitjançant ecografia transrectal) sol ser un factor clau inclòs en els calculadors de risc de CaP, no sembla que la seva incorporació al test de l'índex 4K aportí un augment apreciable en la seva eficàcia. Un estudi realitzat per Carlsson et al. (137) valorà el perfil de 4 de cal·licreïnes en dues cohorts de 2914 i 740 pacients

INTRODUCCIÓ

amb PSA ≥ 3 $\mu\text{g/L}$. A la primera cohort, l'addició del volum prostàtic al perfil de 4 cal·licreïnes augmentà l'AUC de 0,856 a 0,860, mentre que a la segona cohort l'AUC era idèntica tant si s'inclouïa el volum prostàtic com si no (0,802).

Un estudi multicèntric prospectiu del 2015 dut a terme als EUA amb 1012 pacients sotmesos a biòpsia ratifica els resultats observats en estudis previs (138). L'AUC obtinguda per al test de l'índex 4K en la detecció de CaP d'alt risc fou de 0,82. L'estudi documentava que es podrien estalviar un 58% de les biòpsies emprant un valor discriminant del 15%, si bé, però, es deixaria de detectar un 4,7% de CaP d'alt risc. Usant un valor discriminant del 6% la reducció en el nombre de biòpsies era del 30%, però, en canvi, només es deixaven de diagnosticar l'1,3% dels tumors d'alt risc.

D'altra banda, un estudi amb 12.561 homes seguits durant més de 15 anys i en el qual es van recollir mostres als subjectes inclosos als 40, 50 i 60 anys, mostra el valor predictiu de l'índex 4K (139). El resultat d'aquest índex valorat als 50 i 60 anys permetia classificar els pacients en dos grups segons la probabilitat de desenvolupar metàstasis a distància als 20 anys. Els pacients amb PSA ≥ 3 $\mu\text{g/L}$ als 60 anys es classificaren en dos grups els quals, depenent de si el valor de l'índex 4K era $<7,5$ o $\geq 7,5$, tenien un risc significativament diferent de desenvolupar metàstasi a distància als 20 anys d'haver-se realitzat les determinacions. De la mateixa manera, l'índex 4K era també predictiu utilitzant un valor discriminant de 5 considerant els pacients amb PSA ≥ 2 $\mu\text{g/L}$ als 50 anys d'edat.

INTRODUCCIÓ

Taula 4. Rendiment diagnòstic del perfil de 4 cal·licreïnes en la detecció precoç del CaP. AUC: àrea sota la corba; TR: tacte rectal; CaP: càncer de pròstata. Model base de laboratori: edat del pacient, PSA total. Model base clínic: edat del pacient, PSA total, tacte rectal

Autors	Cohort	Augment en AUC: Model base de laboratori vs. Perfil 4 cal·licreïnes	Augment en AUC: Model base clínic vs. Perfil 4 cal·licreïnes + TR
Vickers et al, BMC Medicine, 2008 (130)	740 homes no cribrats, Goteborg, ERSPC	CaP: 0,680 vs. 0,832 CaP alt grau: 0,816 vs. 0,870	CaP: 0,724 vs. 0,836 CaP alt grau: 0,868 vs. 0,903
Vickers et al, J Clin Oncol, 2010 (131)	2914 homes no cribrats, Rotterdam, ERSPC	CaP: 0,637 vs. 0,764 CaP alt grau: 0,776 vs. 0,825	CaP: 0,695 vs. 0,776 CaP alt grau: 0,806 vs. 0,837
Vickers et al, Clin Cancer Res, 2010 (132)	1501 prèviament cribrats, Rotterdam, ERSPC	CaP: 0,557 vs. 0,713 CaP alt grau 0,669 vs. 0,793	CaP: 0,585 vs. 0,711 CaP alt grau: 0,709 vs. 0,798
Vickers et al, Cancer, 2010 (133)	1241 homes sotmesos a biòpsia per concentració de PSA elevada en ≥ 2 visita, Gothenburg, ERSPC	CaP: 0,564 vs. 0,674 CaP alt grau: 0,658 vs. 0,819	CaP: 0,622 vs. 0,697 CaP alt grau: 0,717 vs. 0,828
Gupta et al, Br J Cancer, 2010 (134)	925 homes amb una biòpsia prèvia negativa i PSA ≥ 3 $\mu\text{g/L}$, Rotterdam, ERSPC	No avaluat	CaP: 0,584 vs. 0,681 CaP alt grau: 0,764 vs. 0,873
Benchikh et al, BMC Cancer, 2010 (135)	262 homes, la biòpsia es va basar en el criteri clínic, i TR o PSA addicional, Tarn, ERSPC	No avaluat	CaP 0,628 vs. 0,782 CaP alt grau: 0,767 vs. 0,870
Vickers et al, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011 (136)	792 homes amb PSA ≥ 3 $\mu\text{g/L}$, Malmö Diet and Cancer cohort	CaP: 0,654 vs. 0,751 CaP palpable: 0,708 vs. 0,803	No avaluat

3.4. Gen de fusió *TMPRSS2:ERG*

Les fusions de gens són freqüents en els tumors hematològics (*BCR-ABL* en la leucèmia mieloide crònica) però no s'havien identificat en tumors epitelials sòlids fins a l'aparició de les tecnologies de seqüenciació més sofisticades. El primer gen de fusió descrit en CaP per Tomlins et al. l'any 2005 (140) estava format pel promotor de la proteasa transmembrana serina 2 (*TMPRSS2*) fusionat amb la seqüència codificant dels membres de la família del gen del virus E26 de l'eritroblastosis (*ETS*). El gen *TMPRSS2* és regulat per andrògens i codifica una serín proteasa transmembrana específica de la pròstata. Els membres de la família *ETS* són factors de transcripció oncogènics que contenen una regió d'unió *Ets* a ADN altament conservada i un domini regulador N-terminal (141,142). Per tant, la fusió d'aquests gens condueix a la producció de factors de transcripció *ETS* sota el control del promotor sensible a andrògens de *TMPRSS2*. El resultat és una sobreexpressió dels membres de la família del gen *ETS*, que poden induir l'expressió del gen diana. La fusió més comú és amb *ERG*, un membre de la família *ETS*, donant com a resultat la fusió *TMPRSS2:ERG*. La fusió *TMPRSS2* amb *ERG* s'observa en el 15-59% dels CaP (143). *TMPRSS2* també s'ha identificat en fusions amb altres membres de la família *ETS* com són *ETV1*, *ETV4*, i *ETV5* en CaP. *ERG* codifica per múltiples ARNm diferents a causa de l'*splicing* alternatiu. Aquest *splicing* alternatiu de transcrits d'*ERG* dona com a resultat la traducció de diferents isoformes de la proteïna *ERG* (141,144). Així, s'han identificat també moltes variants diferents de la fusió *TMPRSS2:ERG*, segons quins siguin els exons inclosos en la transcripció de cada variant particular. Entre les variants dels transcrits del gen de fusió *TMPRSS2:ERG*, T1-E4 és el més comú (T representa l'últim exó de *TMPRSS2* en la fusió i E el primer exó d'*ERG*).

La prevalença d'aquestes fusions de gens, en particular *TMPRSS2:ERG*, les fa especialment atractives com a possibles biomarcadors diagnòstics i pronòstics del CaP, així com dianes potencials per a tractaments individualitzats.

3.4.1 Utilitat diagnòstica i pronòstica del gen de fusió *TMPRSS2:ERG*

L'expressió del gen de fusió *TMPRSS2:ERG* s'analitza en les mostres d'orina obtingudes després d'un massatge de pròstata per mitjà de qRT-PCR. Per normalitzar el senyal de *TMPRSS2:ERG* es fa servir una raó amb l'ARN missatger del PSA.

La combinació de l'índex *TMPRSS2:ERG* juntament amb l'índex PCA3 s'ha proposat com una forma de millorar la predicció de CaP a la biòpsia. Un estudi multicèntric publicat per Leyten et al. (145) va avaluar prospectivament la utilitat diagnòstica dels índexs PCA3 i *TMPRSS2:ERG* en 443 pacients sotmesos a biòpsia, trobant que els dos índexs junts augmentaven significativament el valor predictiu obtingut amb el calculador de risc ERSPC, el qual inclou el PSA i diverses variables clíniques. L'AUC va augmentar de 0,799 a 0,833 per al calculador de risc ERSPC en afegir l'índex PCA3, i a 0,842 quan els índexs PCA3 i *TMPRSS2:ERG* s'afegiren. A més, *TMPRSS2:ERG* -però no PCA3- es va associar amb el grau de Gleason i l'estadi clínic del tumor.

Més recentment, Tomlins et al. (146) també proposaren la combinació dels índexs PCA3 i *TMPRSS2:ERG* amb la concentració sèrica de PSA com una eina útil per a la detecció de CaP. L'estudi, prospectiu, dut a terme en tres centres i realitzat en 1244 pacients sotmesos a biòpsia, va mostrar el valor dels índexs de PCA3 i *TMPRSS2:ERG* quan s'afegiren al calculador de risc PCPT (*Prostate Cancer Prevention Trial*), basat en PSA i diverses variables clíniques. Les AUC van augmentar de 0,639 per al calculador de risc PCPT a 0,739 i 0,762 mitjançant l'addició de l'índex *TMPRSS2:ERG* sol o junt amb l'índex PCA3, respectivament. També es van avaluar ambdós biomarcadors per predir el CaP d'alt risc, sent els respectius valors d'AUC de 0,707 (pel calculador de risc PCPT), 0,752 (afegint *TMPRSS2:ERG*) i 0,779 (afegint *TMPRSS2:ERG* i PCA3). El model que inclou el calculador de risc PCPT i els índexs PCA3 i *TMPRSS2:ERG*, anomenat *My Prostate Score* (MIPS), permetria evitar el 36% de les biòpsies usant un valor discriminant del 15%, tot i que deixaria de diagnosticar l'1,6% de tumors d'alt risc. El valor de MIPS ha estat qüestionat per Stephan et al. (147) comparant els índexs PCA3, *TMPRSS2:ERG*, PSA i PHI en una sèrie de 246 pacients, inclosos 110 pacients amb CaP. Els autors van obtenir una AUC per a MIPS de 0,748. L'eficàcia diagnòstica més alta es va trobar per a un model que incloïa PCA3 i PHI, amb AUCs de 0,757 i 0,752, utilitzant una xarxa neuronal artificial i una anàlisi de regressió logística, respectivament. Els

autors van argumentar que el potencial clínic de l'índex *TMPRSS2:ERG* està limitat per la seva baixa prevalença en pacients amb CaP.

Des que el gen de fusió *TMPRSS2:ERG* fou identificat, no hi ha hagut unanimitat en els diferents estudis sobre els seus efectes sobre l'agressivitat i el pronòstic del CaP. Alguns grups no trobaren associació entre els càncers amb la fusió *TMPRSS2:ERG* i l'estadi clínic, el grau de Gleason, la recurrència, la progressió i el pronòstic (148-156). Els CaP positius al gen de fusió han estat també relacionats amb un pronòstic favorable, millor supervivència i menor grau de Gleason (157,158). Hermans et al. (159) trobaren un nou transcrit de *TMPRSS2* involucrat en la fusió que començava en un exó alternatiu -designat com exó 0- el qual quan estava involucrat en la fusió s'associava amb un comportament menys agressiu del càncer i per tant amb un pronòstic favorable. No obstant, el gen de fusió també ha estat relacionat amb un mal pronòstic del CaP. Fitzgerald et al. (156) trobaren que un nombre de còpies del gen de fusió augmentat està relacionat amb una supervivència disminuïda. També s'ha relacionat la fusió *TMPRSS2:ERG* amb la recidiva bioquímica (160-162). Rostad et al. (163) han trobat fusions *TMPRSS2:ERG* associades amb concentracions elevades de PSA, estadi avançat, i grau de Gleason elevat. Alguns autors han documentat que els càncers amb la fusió *TMPRSS2:ERG* estan associats amb tumors d'alt grau (164), i són més propensos a la metàstasi (165). Un altre estudi va demostrar que hi ha relació entre els tumors positius a fusió *TMPRSS2:ERG* i mortalitat específica per CaP (166).

Diferents variants de transcrits de *TMPRSS2:ERG* també s'han relacionat amb els indicadors de mal pronòstic. Wang et al. (144) trobaren una regió de 72 parells de bases expressada de forma variable, que quan està present, fa augmentar la proliferació, la invasió, i la mortalitat. Aquest grup també va trobar que la fusió T2-E4 estava associada amb malaltia agressiva. També s'ha trobat que una longitud completa d'*ERG* està associada amb una baixa diferenciació del tumor, major grau de Gleason, i l'aparició de recidiva bioquímica (167). A més, les fusions T1-E2, T1-E3, i T2-E4 estan associades amb una malaltia més agressiva, invasió de vesícules seminals, i recidiva bioquímica (168).

La pèrdua del gen supressor tumoral *PTEN* s'observa freqüentment en el CaP, fet que resulta en la desregulació de la supervivència cel·lular, el creixement i la proliferació. Estudis previs han trobat que *PTEN* es perd o està mutat en el 30 a 80% de CaP primari, i en el 50% de les metàstasis òssies de CaP. La pèrdua de *PTEN* juntament amb la fusió *TMPRSS2:ERG* estan associats amb un mal pronòstic. Carver et al. (169) van trobar que la pèrdua de *PTEN* en

combinació amb el reordenament d'*ERG* són predictors independents de recidiva bioquímica.

Sembla que la majoria dels estudis indiquen que la presència de l'expressió del gen de fusió *TMPRSS2:ERG* en pacients de CaP s'associa amb mal pronòstic. No obstant això, es requereixen estudis més amplis ja que diverses publicacions (144, 156-168) han revelat resultats oposats respecte al valor pronòstic de l'expressió del gen de fusió *TMPRSS2:ERG*.

Així doncs, les diferències en el valor pronòstic del gen de fusió *TMPRSS2:ERG* podrien explicar-se en relació amb els exons de cada gen que participen en la fusió (170), la presència de múltiples còpies del transcrit, o la forma com s'ha produït el reordenament (deleció o translocació intercromosòmica) (171). Una major comprensió dels mecanismes biològics emprats per les proteïnes de fusió *ERG* en la progressió del CaP ajudarà a classificar millor els pacients segons el pronòstic.

3.5. microARNs

3.5.1 Biogènesi i funció dels microARNs

La participació dels gens codificants de proteïnes en el desenvolupament de càncer s'ha estudiat àmpliament en els últims anys. Tot i que el 90% del genoma humà es transcriu a ARN missatger, només el 2% codifica per proteïnes, de manera que hi ha un gran nombre d'ARNs que no codifiquen proteïnes. Les dades recents suggereixen que aquesta porció del genoma que no codifica per proteïnes també juga un paper en la carcinogènesi. Aquests ARN no codificants inclouen petits ARNs nucleolars, miARNs, petits ARNs d'interferència, ARNs *piviinteracting* i ARNs llargs no codificants (172), com *PTENP1* (173) -un pseudogen del supressor de tumors *PTEN*-, i *PCA3*.

Els miARNs són ARNs petits (17-22 nucleòtids) no codificants, d'una sola cadena, que regulen negativament l'expressió de gens a través de la unió amb les seves dianes en l'ARN missatger. El primer miARN descrit va ser lin-4, identificat al 1993 per Lee et al. (174) en el nematode *Caenorhabditis elegans*. Actualment, d'acord amb la base de dades miRBase.org, s'han

identificat 28.645 miARNs en diferents espècies (miRBase, release 21: juny 2014) (175), dels quals 2588 miARNs madurs han estat reconeguts en els éssers humans.

La biogènesi dels miARNs és un procés complex que s'inicia en el nucli de la cèl·lula amb la formació del miARN primari de doble cadena (pri-miARN), per l'acció de l'ARN polimerasa II. A continuació, els pri-miRNAs són tractats per un microprocessador que conté l'enzim Drosha ARNasa III i la proteïna DGCR8, donant lloc a la formació del precursor de miARN (pre-miARN). Després d'això, el pre-miARN es transfereix al citoplasma a través de l'exportina 5 i el cofactor Ran GTP; allà, el pre-miARN és processat pel Dicer ARNasa, donant lloc a la formació d'un ARN de doble cadena d'aproximadament 22 nucleòtids, que conté dues cadenes de miARN: una es converteix en el miARN madur i l'altra és el miARN passatger o 5p, el qual normalment es degrada encara que en certes patologies es pot detectar. El miARN madur s'uneix a la proteïna Argonaut (AGO) i forma el complex silenciador induït per ARN (RISC). Després de ser incorporats en el complex RISC, els miARNs poden exercir la funció de silenciament dels corresponents ARNm. Els miARNs extracel·lulars poden estar en formes diverses per tal d'evitar la seva degradació: empaquetats en micropartícules (exosomes, microvesícules i cossos apoptòtics), vinculats a proteïnes d'unió a ARN (AGO-2, nucleofosmina-1) o associats amb lipoproteïnes d'alta densitat.

Els avenços en la tecnologia i l'estabilitat dels miARNs en diferents tipus de mostres (176) han permès identificar el paper dels miARNs en diverses malalties (177). Mitjançant els microarrays es poden identificar perfils de miARNs específics per diferents tipus de càncer. La qRT-PCR s'ha utilitzat generalment per validar els perfils de miARNs seleccionats a través dels microarrays. El desenvolupament de la PCR digital podria millorar el rendiment de la qRT-PCR. La PCR digital és un mètode directe per a la quantificació d'àcids nucleics, útil per mostres amb poca abundància de miARNs, i que mostra un alt grau de sensibilitat i precisió en comparació amb la qRT-PCR (178,179). Finalment, les plataformes de *next generation sequencing* (NGS) permeten descobrir nous miARNs, generar perfils d'expressió completa, distingir miARNs de seqüència similar i identificar mutacions puntuals.

3.5.2 Paper dels miARNs en el càncer de pròstata

Diferents articles han reportat l'expressió alterada de miARN en el CaP, mostrant la seva desregulació en diversos processos, incloent la proliferació cel·lular, la diferenciació i la progressió (180-182). Els miARNs implicats en la patogènesi del CaP i les seves vies de senyalització es mostren a la figura següent (figura 3).

La desregulació del cicle cel·lular condueix a la proliferació cel·lular aberrant que caracteritza el càncer. Els miARNs interactuen amb gens diana que codifiquen per proteïnes del cicle cel·lular, conferint el potencial per regular la divisió cel·lular i la progressió del cicle cel·lular. Així, Lewis et al. (183) van mostrar que miR-888 inhibeix el gen diana *retinoblastoma-like 1*, que bloqueja la progressió de la primera fase *gap* del cicle cel·lular a la fase de síntesi mitjançant la unió i la inhibició dels factors de transcripció E2F.

També alguns miARNs estan involucrats en la promoció o inhibició de l'*stemness* de les cèl·lules mare canceroses (CSC). Les CSC són una subpoblació de cèl·lules canceroses de la massa tumoral que juguen un paper important en la progressió del tumor i la metàstasi en diversos tipus de càncers, incloent el CaP. Les CSC del CaP mantenen les propietats d'auto-renovació i diferenciació i poden donar lloc a més cèl·lules canceroses. Els miARNs expressats de forma alterada poden provocar la desregulació de les vies de senyalització específiques associades amb les funcions de les CSC. En particular, alguns membres de la família de miR-34 o let-7 (184,185) han estat implicats en la regulació de les propietats de les CSC del CaP.

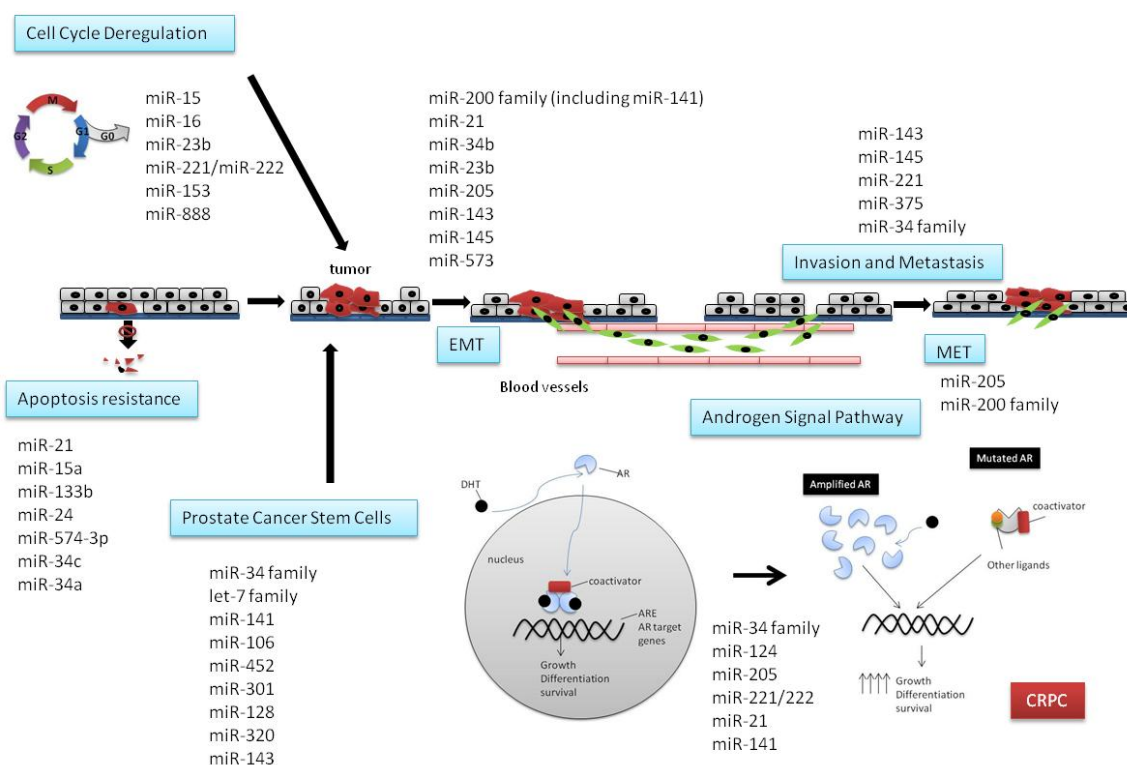
D'altra banda, els miARNs també participen en la resistència a l'apoptosi en el CaP a través de diferents mecanismes. Com a exemple d'aquest fet, l'expressió de miR-21 està generalment augmentada en CaP i regula directament *PTEN* donant com a resultat una reducció significativa de l'apoptosi en el CaP. MiR-21 també regula el gen *MARCKS*, conduint a una resistència a l'apoptosi i per tant una proliferació aberrant (186,187) (figura 4). Un altre mecanisme de regulació de l'apoptosi és a través de la regulació dels membres de la família *Bcl-2*. Alguns membres de la família de miR-34 o el supressor de tumors miR-205 (que té com a diana directa *Bcl-2* en el CaP), en són alguns exemples (188,189).

Per un altre costat, la transició epitelial-mesenquimal (EMT) és un procés biològic que permet a una cèl·lula epitelial polaritzada sotmetre's a múltiples canvis bioquímics per assumir un fenotip de cèl·lula mesenquimal, el qual li confereix una major capacitat migratòria, invasivitat i propietats de cèl·lules mare (190). Les cèl·lules del CaP se sotmeten

INTRODUCCIÓ

als canvis propis de l'EMT, envaint els teixits circumdants i colonitzant diversos teixits a través de la sang o la limfa per generar metastasis. Les cèl·lules metastàsiques poden revertir mitjançant la transició mesenquimal-epitelial (MET) per tornar a adquirir característiques similars a les cèl·lules epitelials del tumor primari. Alguns miARNs són reguladors d'EMT i MET a través de la regulació de l'expressió de proteïnes clau d'aquests processos. Els membres de la família miARN-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 i miR-429) tenen un paper fonamental en la regulació del procés d'EMT a través de la repressió de marcadors mesenquimals, com la vimentina, i la sobrerregulació de marcadors epitelials, com ara E-cadherina, regulant directament als gens *ZEB1* i *ZEB2*, aquest últim també diana directa de miR-145 (191,192) (figura 4). Segons Ren et al. (193), *ZEB2* també reprimeix la transcripció de miR-145, creant un bucle de retroalimentació negativa doble entre *ZEB2* i miR-145, fet que esdevé un element clau en el control de l'EMT en l'aparició de la metastasi òssia del CaP.

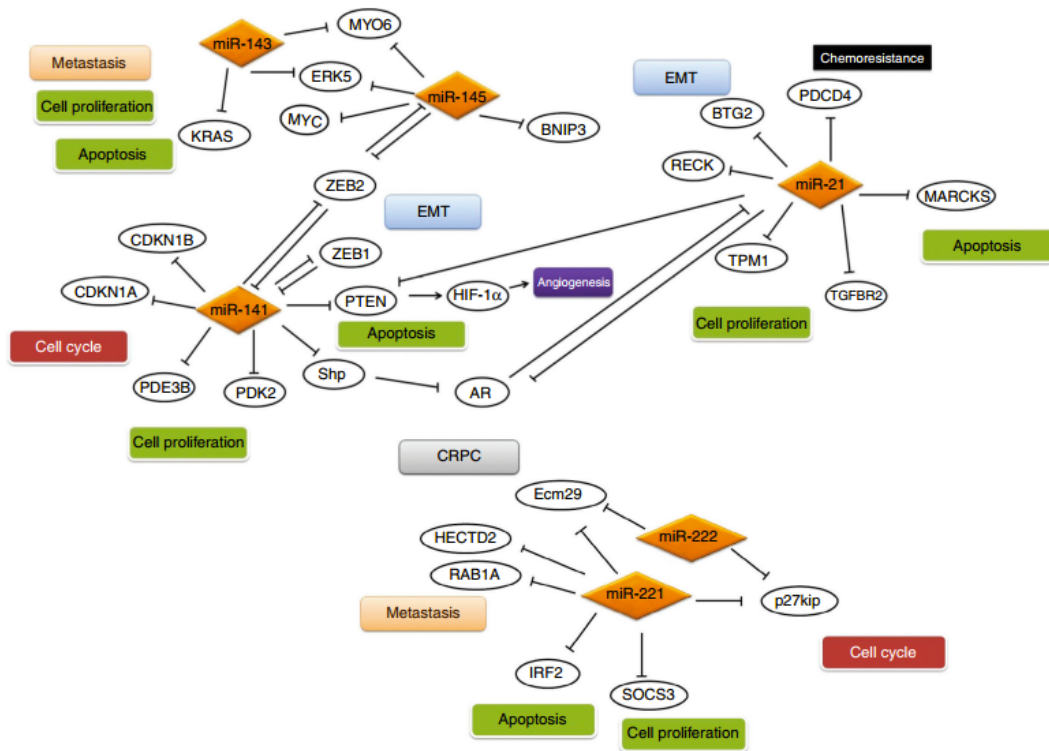
Figura 3. Els miARNs regulen la resistència a l'apoptosi, el cycle cel·lular, els processos d'EMT i MET, les stem cells derivades de càncer i la via de transducció del senyal per andrògens en el CaP. (Figura extreta de l'article: *miRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer*. Filella X, Foj L. Clin Chem Lab Med. 2016 Jan 9. pii: /j/cclm.ahead-of-print/cclm-2015-1073/cclm-2015-1073.xml. doi: 10.1515/cclm-2015-1073)



A més, la sobreregulació de miR-21 en el CaP també juga un paper important en el procés d'EMT (figura 4) a través de la disminució de l'expressió de *BTG2*, iniciant així l'adquisició de marcadors luminals i l'EMT (194,195). Un altre gen relacionat amb la invasió i regulat per miR-21 és *RECK*, un inhibidor de metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular. Neutralitzant miR-21 es reprimeix la quantitat de metal·loproteïnases de la matriu i es reverteix el fenotip invasiu (196). Recentment, Wang et al. (197) van trobar que l'expressió de miR-573 era significativament menor en els teixits metastàtics que en el CaP primari. A més, van demostrar que miR-573 modula l'EMT a través del gen diana *fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)*, promovent el procés de metastasi de les cèl·lules de CaP, i també van suggerir miR-573 com un potencial biomarcador i/o diana terapèutica per al maneig del CaP. Una via important a tenir en compte per a la progressió oncogènica del CaP és la via de senyalització a través del receptor d'andrògens (AR). Els pacients amb CaP, amb el pas del temps, adquireixen resistència al tractament hormonal i el tumor progressa a CRPC. A més, les interaccions de miARNs amb el gen *AR* juguen un paper determinant en la progressió de CaP sensible a la castració a un CRPC incurable (198). Diversos miARNs (miR-21, miR-31, miR-34 i miR-124) poden regular l'expressió del gen *AR*, i al mateix temps, *AR* pot regular l'expressió de diversos miARNs (miR-21, miR-27a, miR-34, miR-125b, miR-221 i let-7) (199). Goto et al. (200) han demostrat recentment que miR-221 i 222 es troben infraregulats significativament en mostres de CRPC, fins i tot quan aquest clúster s'ha descrit anteriorment com sobreregulat en CaP (201,202). Aquest fet mostra l'estat dinàmic dels miARNs en el desenvolupament del CaP, podent regular els mateixos miARN diferents dianes en funció del punt de la progressió del càncer. La pèrdua del clúster supressor de tumors miR-221/222 intensifica la migració i la invasió en les cèl·lules canceroses del CaP a través de l'oncogen *Ecm29*.

Per altra banda, Ottman et al. (203), comparant línies cel·lulars de CaP sensibles i resistents a andrògens, van identificar 43 miARNs que es troben alterats significativament en les cèl·lules canceroses resistents al tractament, fet que suggereix la seva implicació en el desenvolupament del CRPC. Els canvis específics en l'expressió dels miARNs en pacients amb CRPC es podrien utilitzar com una nova eina de predicció de la susceptibilitat a desenvolupar CRPC. A més, les noves estratègies terapèutiques basades en l'ús dels miARN com a fàrmacs o dianes de fàrmacs podrien explorar-se en el futur per al tractament de pacients amb CRPC.

Figura 4. MiR-21, miR-141, miR-143, miR-145, miR-221 i miR-222 en la patogènesi del CaP: papers i interaccions amb els gens diana. (Figura extreta de l'article: *miRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer*. Filella X, Foj L. Clin Chem Lab Med. 2016 Jan 9. pii: /j/cclm.ahead-of-print/cclm-2015-1073/cclm-2015-1073.xml. doi: 10.1515/cclm-2015-1073)



3.5.3 Expressió de miARNs en càncer de pròstata

L'estudi de Mitchell et al. (204) fou el primer a documentar la presència de miARNs en el sèrum de pacients amb CaP. Els autors van demostrar l'any 2008 que els miARNs originats en xenoempelts de CaP humans entren a la circulació i poden ser identificats en plasma. A més, també van trobar que miR-141 estava significativament més elevat en els pacients amb CaP avançat que en els controls, mostrant una AUC de 0,907.

Més recentment, diversos estudis han identificat -per mitjà de tècniques de microarrays- perfils de miARNs circulants útils per a la detecció i pronòstic de CaP. No obstant, les diferències entre els perfils són substancials i només miR-141, miR-375 i miR-21 apareixen repetidament en diferents estudis.

Witwer (205) subratllà que existeix una superposició limitada entre les troballes de miARNs d'estudis similars en la mateixa malaltia, probablement a causa de raons metodològiques. De fet, tot i que els miARNs són força estables en plasma i sèrum, es requereix l'optimització i l'estandardització de la metodologia utilitzada per l'anàlisi de miARNs per obtenir resultats d'alta qualitat. Fins al moment, encara existeixen diferències a causa dels diversos tipus de mostra estudiats (amb diferències entre sèrum i plasma, i en el plasma, segons els diferents anticoagulants usats); el reactiu específic utilitzat en l'aïllament dels miARNs; la realització d'una PCR de preamplificació amb l'objectiu d'obtenir més cADN; i la plataforma utilitzada per a la qRT-PCR (AbiPrism, LightCycle, etc.); l'ús de controls endògens o exògens (per exemple, cel-miR-39) per tal de normalitzar els resultats, i el mètode de càlcul utilitzat, essent el $-2\Delta\Delta C_T$ probablement el més freqüent.

Fins al moment, un dels estudis més amplis sobre la utilitat clínica de miARNs circulants és el realitzat per Mihelich et al. (206), que mesuraren l'expressió de 21 miARNs en 50 pacients amb HBP i 100 pacients amb CaP en estadis T1-T2, classificats segons el grau de Gleason. Els autors proposen un perfil de 15 miARN (let-7a, miR-103, miR-451, miR-24, miR-26b, miR-30c, miR-93, miR-106a, miR-223, miR-874, miR-146a, miR-125b, miR-100, miR-107 i miR-130b) per distingir amb gran precisió els pacients amb CaP d'alt grau dels pacients amb HBP i CaP de baix grau. Set d'aquests miARNs (miR-451, miR-106a, miR-223, miR-107, miR-130b, let-7a i miR-26b) també eren significativament inferiors en els pacients amb CaP amb recidiva bioquímica després de prostatectomia radical en comparació amb aquells sense recidiva bioquímica. Curiosament, d'acord amb una anàlisi de regressió logística, els dos perfils de miARNs van ser millors predictors del grau de Gleason o recurrència bioquímica que altres factors prequirúrgics com el PSA, l'edat i el percentatge de cilindres positius. De la mateixa manera, Shen et al. (207) van trobar un perfil compost per miR-20a, miR-21, miR-145 i miR-221 en plasma capaç de predir l'agressivitat del CaP, distingint els pacients amb CaP de risc baix i alt segons els criteris de D'Amico, amb una AUC de 0,824. No obstant això, els perfils proposats per aquests grups no se solapen en la composició dels miARNs. Chen et al. (208) avaluaren 1146 miARNs en el plasma de 25 pacients amb CaP (15 no metastàtic, 10 metastàtic) i de 17 pacients amb HBP, identificant un grup de cinc miARNs (miR-622, miR-1285, let-7e, let-7c, i miR-30c) que podrien diferenciar el CaP de la HBP i de controls sans amb una gran eficàcia, mostrant AUCs de 0,924 i 0,860, respectivament.

Moltzahn et al. (209) identificaren en sèrum un perfil de 12 miARNs per mitjà d'un *microarray*. Les AUCs per a miR-106a, miR-1274, miR-93, miR-223, miR-874, miR-1207 i miR-24

oscil·laren de 0,812 a 0,928, mostrant una tendència a la correlació amb l'índex CAPRA, que és una avaluació del risc de CaP basada en l'edat del pacient, la concentració sèrica de PSA, l'estadi clínic del tumor, el grau de Gleason i el percentatge de cilindres positius en la biòpsia. Els autors reportaren una sobrerregulació de miR-30c, miR-93, miR-106a, miR-223 i miR-451 en pacients amb CaP d'alt risc de progressió comparats amb els de baix risc. Aquests resultats són oposats als indicats per l'estudi abans mencionat de Mihelich et al. (206) que mostraren que aquests miARNs estaven sobreexpressats en els pacients amb HBP i CaP de baix risc comparat amb els pacients amb CaP d'alt risc. Aquestes diferències podrien ser atribuïdes a la manca d'estandardització en la recollida de la mostra i en la mesura dels miARNs.

Diversos autors han demostrat el paper dels biomarcadors urinaris en la detecció del CaP. L'orina és una manera possible d'obtenir nous biomarcadors del CaP, ja que per la localització anatòmica de la pròstata en relació amb la uretra, s'obtenen cèl·lules canceroses exfoliades o productes secretats pel sistema ductal prostàtic. Segons Weber et al. (210), la concentració i el nombre de miARNs detectables en l'orina és menor que en el plasma, fet que suggereix que es depuren en els ronyons o són destruïts a l'orina. No obstant això, l'enriquiment de l'orina amb cèl·lules prostàtiques per mitjà d'un massatge de la pròstata és una manera d'augmentar la presència de biomarcadors de la pròstata, millorant l'eficàcia dels tests (71). A més, el contingut de proteïna en l'orina és menor que en el sèrum i plasma, fet que redueix les interferències en l'aïllament de miARNs (211). No obstant, l'anàlisi de miARNs en orina té l'inconvenient derivat de la baixa concentració d'àcids nucleics en aquest fluid. Els mètodes per obtenir ARN basats en l'enriquiment d'ARNs petits, i una reacció de preamplificació abans de la qRT-PCR podrien ser necessaris per mesurar adequadament els miARNs en l'orina. La majoria dels estudis existents analitzaren els miARNs en el sediment de l'orina, però també n'hi ha que utilitzen orina total i la fracció lliure de cèl·lules, generalment obtingudes després d'un tacte rectal o d'un massatge prostàtic.

Les AUCs dels diferents estudis publicats sobre miARNs en l'orina oscil·len entre 0,639 i 0,769 (183, 212-222). Per desgràcia, no hi ha un consens en els miARNs seleccionats per a aquests estudis ni congruència amb els resultats publicats en sang. Per altra banda, els miARNs no s'han associat a recidiva bioquímica (217), concentracions sèriques de PSA (220) o grau de Gleason (216,220), tot i que d'acord amb Lewis et al. (183), miR-888 mesurat en el sobrenedant -però no en el sediment urinari- s'associa amb CaP d'alt grau. Finalment, dir també que el valor de miARNs podria augmentar si s'avaluen en associació amb altres tests en la detecció de CaP. Salido-Guadarrama et al. (223) identificaren un perfil basat en miR-

100/200b en l'orina obtinguda després de massatge prostàtic comparant 73 pacients amb CaP d'alt risc i 70 pacients amb HBP. L'AUC per aquest perfil (0,738) fou superior a l'obtinguda per PSA total (0,681) i %fPSA (0,710). Afegint el perfil miR-100/200b a un model multivariat basat en edat, tacte rectal, PSA total i %fPSA, l'AUC augmentà de 0,816 a 0,876. D'altra banda, Egidi et al. (221) obtingueren una AUC de 0,880 amb la combinació de l'ARNm de la cal·licreïna humana 3 amb miR-19a-3p, mentre que Yun et al. (222) documentaren AUCs de 0,761 i 0,738 per hsv1-miR-H18 i hsv-2-miR-H9-5p, respectivament, per pacients en la zona grisa del PSA.

Els principals estudis que avaluen la utilitat dels miARNs en sang i orina estan resumits a la taula 5.

3.6. Exosomes i càncer de pròstata

Els exosomes són vesícules petites (30-150 nm) de doble membrana lipídica d'origen endocític secretades per la majoria de tipus de cèl·lules, que contenen proteïnes, lípids i àcids nucleics. La base de dades ExoCarta (<http://exocarta.org/>) conté informació sobre les molècules identificades en exosomes de múltiples organismes. Actualment, ExoCarta conté informació sobre 41.860 entrades de proteïnes, 4.946 entrades d'ARNm i 2.838 entrades de miARNs que s'han identificat a partir de 286 estudis d'exosomes. Els exosomes van ser descrits inicialment per Trams et al. (224) com vesícules de membrana exfoliades, obtingudes a partir de cultius de cèl·lules neoplàsiques. La seva presència s'ha confirmat més tard en el sèrum i plasma, així com en altres fluids biològics, incloent orina, saliva, líquid ascític, llet materna i líquid amniòtic. L'estudi de nous biomarcadors en exosomes és un camp prometedor, ja que són extraordinàriament estables en els fluids corporals i el seu contingut està protegit de la degradació enzimàtica per la bicapa lipídica (225,226).

S'ha demostrat que les cèl·lules canceroses alliberen altes quantitats d'exosomes, els quals poden influir en la iniciació del tumor, el creixement i la progressió, així com amb la resistència als tractaments. S'ha trobat una quantitat significativament major d'exosomes en el sèrum de pacients amb càncer d'ovari en comparació amb dones sanes o amb malalties ovàriques benignes. A més, la quantitat d'exosomes s'ha correlacionat amb l'estadi clínic del càncer d'ovari, mostrant quantitats elevades en pacients en una fase avançada (227). Duijvesz et al. (228) van demostrar que els biomarcadors exosomals CD9 i CD63 en orina recollida

després de tacte rectal eren significativament més elevats en homes amb CaP. Resultats semblants s'han trobat en altres tumors, incloent càncer de pulmó, càncer colorectal i leucèmia limfocítica crònica (229-231).

La implicació emergent dels exosomes en la carcinogènesi es deu a la seva participació en la comunicació intercel·lular. Els exosomes derivats de tumors intercanvien informació amb altres cèl·lules canceroses i també amb altres tipus de cèl·lules, incloses les cèl·lules de l'estroma i la matriu extracel·lular, establint així les condicions favorables per al creixement del tumor i la invasió. Els exosomes poden estimular les cèl·lules diana a través de diferents vies, incloent la interacció amb receptors específics de membrana, l'endocitosi i la transferència horitzontal de proteïnes i molècules d'ARNm, ARN no codificants grans i miARNs (232). Els estudis publicats mostren que els exosomes derivats de cèl·lules canceroses contribueixen activament a la progressió de la malaltia (233). Franzen et al. (234) demostraren que el procés d'EMT a les cèl·lules urotelials està induït per exosomes derivats de càncer de bufeta invasiu. Dades semblants s'han documentat per a CaP. Abd Elmageed et al. (235) van demostrar que els exosomes de cèl·lules de CaP poden induir la transformació neoplàsica de les cèl·lules mare derivades de teixit adipós a través de la transferència horitzontal de diversos factors oncogènics, incloent els oncomiRs miR-125b, miR-130b i miR-155. A més, d'acord amb Hosseini-Beheshti et al. (236), els exosomes derivats de cèl·lules de CaP poden contribuir a la progressió del càncer, reduint l'apoptosi, augmentant la proliferació de cèl·lules canceroses, i induint la migració cel·lular en cèl·lules LNCaP i RWPE-1.

Malgrat el creixent interès en el paper dels exosomes en diverses malalties i el seu ús en estudis funcionals i pel descobriment de nous biomarcadors, no existeix encara un mètode estàndard per obtenir exosomes purs i ben caracteritzats. El mètode més comú per l'aïllament d'exosomes és la centrifugació diferencial, que consta de diverses etapes de centrifugació amb l'augment gradual de la força centrífuga per sedimentar seqüencialment les cèl·lules (300 g), microvesícules (10.000 g) i exosomes (100.000 g) (237). A la pràctica s'utilitzen moltes variacions d'aquestes velocitats. L'ús de filtres de 0,45 i 0,2 µm s'utilitza opcionalment abans de sedimentar els exosomes. A més, l'aïllament basat en gradients de densitat, mitjançant sucrosa o iodixanol, es pot utilitzar per obtenir preparacions d'exosomes més pures. També s'han desenvolupat en els últims anys reactius comercials fàcils d'usar, que inclouen solucions de precipitació, com ara els kits ExoQuick™ o Total Exosome Isolation™, i mètodes basats en columnes, com exoRNeasy® sèrum/plasma. El microscopi electrònic de transmissió o la

immuno-electromicroscòpia es fan servir per a comprovar la presència dels exosomes. A més, el Western blot i l'ELISA també es poden utilitzar per detectar diversos marcadors exosomals (com CD9, CD63 i CD81) amb l'objectiu d'identificar les vesícules aïllades com a exosomes. Pocs estudis han avaluat els biomarcadors exosomals per la detecció i el pronòstic del CaP. Øverbye et al. (238) estudiaren el proteoma dels exosomes urinaris en 15 subjectes sans i 16 pacients amb CaP mitjançant espectrometria de masses per identificar-ne les proteïnes. Aquest estudi va mostrar que 246 proteïnes estaven alterades de manera significativa en els exosomes urinaris de pacients amb CaP. Els autors van trobar que 17 proteïnes presentaven sensibilitats per sobre del 60% amb un 100% d'especificitat. Es registraren les majors sensibilitats per a la proteïna transmembrana 256 (TM256) (94%), la proteïna LAMTOR1 (81%) i la proteïna ADIRF (81%). Els autors obtingueren una AUC de 0,87 per TM256, que va augmentar a 0,94 mitjançant la combinació amb LAMTOR1.

D'altra banda, Dijkstra et al. (239) realitzaren una comparació de *PCA3* i *TMPRSS2:ERG* entre el sediment urinari i els exosomes, conclouent que els exosomes semblen ser una font més robusta de biomarcadors, encara que una proporció significativa de les mostres no es pogueren avaluar, ja que no arribaven al límit de detecció analítica. La quantitat de *PCA3* i *TMPRSS2:ERG* exosomals van ser significativament més elevats quan l'orina es recollia després d'un massatge de pròstata. Més recentment, resultats publicats per aquest mateix grup basats en 29 homes sotmesos a biòpsia de pròstata mostraren que *PCA3* i *ERG* donen millors resultats en orina total que en el sediment urinari o en els exosomes (240). No es van trobar diferències significatives per cap d'aquests biomarcadors en exosomes comparant els pacients amb CaP i sense CaP.

Donovan et al. (241) aportaren resultats oposats a l'estudiar la combinació de l'ARNm exosomal de *PCA3* i d'*ERG* en la detecció de CaP d'alt grau. Els autors van estudiar tots dos biomarcadors en mostres d'orina obtingudes sense massatge de pròstata de 195 pacients sotmesos a biòpsia inicial per la concentració sèrica de PSA en la zona grisa. Van demostrar que l'índex EXO106 (obtingut mitjançant la suma de la quantitat normalitzada d'ARNm de *PCA3* i la quantitat d'ARNm d'*ERG* en exosomes) es relaciona amb el grau de Gleason, existint resultats més elevats en els pacients amb un grau de Gleason ≥ 7 . Els autors proposaren combinar l'índex EXO106 juntament amb el PSA, l'edat, l'ètnia i la història familiar de CaP per a la detecció de CaP d'alt grau, mostrant valors predictius negatius i positius de 97,5% i 34,5%, respectivament (AUC: 0,803).

Diversos autors han suggerit que els exosomes obtinguts de la sang i l'orina són una font

consistent de miARNs per a la detecció de diverses malalties (242-245), tot i que altres investigadors subratllen que els exosomes no contenen una quantitat biològicament significativa de miARNs en preparacions estàndard (246). Així, segons Arroyo et al. (247), els miARNs associats a vesícules només són una minoria, mentre que al voltant del 90% dels miARNs en la circulació estan presents en una forma no unida a membrana. En canvi, Gallo et al. (248) van mostrar que la majoria dels miARNs detectables en el sèrum i la saliva es concentren en exosomes. Igualment, Cheng et al. (242) van observar que la proporció més alta de miARN en orina s'extreia dels exosomes.

Diversos estudis han avaluat la utilitat dels miARNs dels exosomes per la detecció del CaP (taula 5). Li et al. (249) trobaren nivells d'expressió de miR-141 significativament més elevats en exosomes que en sèrum. A més, aquests autors van informar que el nivells d'expressió de miR-141 en els exosomes del sèrum eren significativament més elevats en pacients amb CaP en comparació amb els pacients amb HBP i controls sans, trobant la quantitat més alta en pacients amb CaP metastàtic. D'altra banda, segons Huang et al. (250) els nivells d'expressió de miR-1290 i miR-375 en exosomes del plasma estaven significativament associats amb una supervivència global disminuïda. L'addició d'aquests nous biomarcadors en un model de predicció del pronòstic clínic millorà el rendiment predictiu amb un augment de l'AUC de 0,66 a 0,73. D'altra banda, Bryzgunova et al. (251) han demostrat recentment resultats prometedors en la detecció del CaP, amb l'anàlisi de miR-19b en exosomes urinaris aïllats per centrifugació diferencial. Finalment, Samsonov et al. (252) trobaren sobreexpressats miR-21, miR-141 i miR-574 en pacients amb CaP en comparació amb els controls sans en exosomes urinaris aïllats mitjançant un mètode basat en aglutinació per lectina. No obstant això, només miR-141 es va trobar sobreexpressat significativament quan els exosomes urinaris s'aïllaven mitjançant centrifugació diferencial.

En els últims anys, les tecnologies NGS han revelat la presència de variants de la seqüència de miARNs, anomenats isomiRs, mostrant la seva utilitat com a biomarcadors. Aquests es generen a partir d'un únic locus d'un miARN durant el seu procés de formació i maduració. Koppers-Lalic et al. (253) van suggerir que els isomiRs de miR-21, miR-375 i miR-204 mesurats en vesícules extracel·lulars de l'orina podien distingir els pacients amb CaP dels controls. Els autors van trobar una AUC de 0,821 per a aquest conjunt d'isomiRs, mentre que l'AUC corresponent al miARN madur era de 0,661. L'existència d'isomiRs podria explicar els desacords sobre la utilitat dels miARNs en la detecció del CaP.

Els resultats preliminars sobre biomarcadors exosomals són prometedors, malgrat els

INTRODUCCIÓ

resultats contradictoris publicats. Es requereixen estudis clínics més amplis i nous avenços en l'estandardització dels procediments d'aïllament i caracterització per tal d'avaluar amb precisió la utilitat clínica dels exosomes.

INTRODUCCIÓ

Taula 5. Estudis de miARNs en pacients amb CaP. AUC: àrea sota la corba, CaP: càncer de pròstata, HBP: hiperplàsia benigna de pròstata, CRPC: CaP resistent a la castració, TR: tacte rectal.

Referència	Mostra	miARNs analitzats	Metodologia	Pacients	Resultats
Mitchell et al, 2008 (204)	Sèrum	miR-100, -125b, -141, -143, -205, i -296	qRT-PCR	25 CaP metastàtics i 25 controls sans	AUC de 0,907 per miR-141 comparant CaP i sans
Mihelich et al, 2015 (206)	Sèrum	21 miARNs	qRT-PCR	100 CaP no tractats (50 baix grau, 50 alt grau) and 50 HBP	Un perfil combinant let-7a, miR-103, -451, -24, -26b, -30c, -93, -106a, -223, -874, -146a, -125b, -100, -107 i -130b distingeix CaP d'alt grau del de baix grau i HBP
Chen et al, 2012 (208)	Plasma	1146 miARNs 8 miARNs seleccionats per l'estudi de validació	llumina's Human miRNA microarray qRT-PCR	Cohort de cribratge: 17 HBP i 25 CaP Cohort de validació: 44 HBP, 54 controls sans i 80 CaP	Un perfil combinant miR-622, -1285, -30c, let-7e i let-7c distingeix CaP d'HBP (AUC: 0,924) o controls sans (AUC: 0,860)
Moltzahn et al, 2011 (209)	Sèrum	384 miARNs 12 miARNs seleccionats per l'estudi de validació	qRT-PCR multiplex	12 CaP de baix risc, 12 CaP de risc intermig, 12 CaP d'alt risc i 12 controls sans	AUCs: miR-106a, 0,928; miR-1274, 0,928; miR-93, 0,907; miR-223, 0,876; miR-874, 0,845; miR-1207, 0,812; miR-24: 0,778 miR-93, -106a i -24 distingeixen els grups de sans i metastàtic
Salido-Guadarrama et al, 2016 (223)	Orina obtinguda després de massatge prostàtic	364 miARNs	MicroRNA TaqMan Low Density Array qRT-PCR	73 pacients amb CaP d'alt risc i 70 pacients amb HBP	AUC per miR-100/200b: 0,738. Afegeint miR-100/200b a un model multivariat basat en l'edat, TR, PSA total i %PSA, l'AUC augmentà de 0,816 a 0,876

INTRODUCCIÓ

Taula 5 (continuació)

Referència	Mostra	miARNs analitzats	Metodologia	Pacients	Resultats
Li et al, 2015 (249)	Exosomes sèrics	miR-141	qRT-PCR	Cohort en sèrum vs cohort exosomes: 20 CaP, 20 HBP, 20 controls sans	miR-141 en exosomes sèrics fou significativament major en pacients amb CaP comparat amb HBP i controls sans
Huang et al, 2015 (250)	Exosomes plasma	let-7c, miR-30a/e, -99a, -1246, -1290, -16, -125a, i -375	Plataforma Illumina HiSeq2000 qRT-PCR	Cohort de cribratge: 23 pacients amb CRPC Cohort de seguiment: 100 pacients amb CRPC	Els exosomes en plasma miR-1290 i miR-375 estaven significativament associats amb supervivència reduïda
Bryzgunova et al, 2016 (251)	Vesícules extracel·lulars totals i fraccions enriquides amb exosomes de l'orina	miR-19b, -25, -125b, i -205	qRT-PCR	20 controls sans i 14 CaP no tractats	miR-19b en vesícules extracel·lulars totals i fraccions enriquides distingeix els pacients amb CaP dels controls sans, amb una especificitat/sensibilitat de 100%/93% i 95%/79%, respectivament, demostrant el valor diagnòstic de les vesícules extracel·lulars
Samsonov et al, 2016 (252)	Exosomes urinaris	miR-21, -107, -141, -221, -298, -326, -375, -432, -574, -2110, -625, -301a, -191	qRT-PCR	35 pacients amb CaP i 35 controls sans	miR-21, -141 i -574 estaven sobreexpressats en pacients amb CaP comparats amb controls sans en exosomes urinaris

HIPÒTESI I OBJECTIUS

La **hipòtesi principal** dels estudis inclosos en aquesta memòria és que els nous biomarcadors de CaP avaluats en aquesta tesi: %[-2]proPSA, PHI, gen *PCA3*, miARNs són útils per millorar l'eficàcia en el diagnòstic del CaP basat en la mesura plasmàtica del PSA i PSA lliure, permetent així reduir el nombre de biòpsies negatives obtingudes amb l'algoritme utilitzat actualment. D'altra banda, aquests biomarcadors s'associen amb l'agressivitat del tumor, cosa que permet distingir els CaP de baix risc dels d'alt risc de progressió.

Per provar aquesta hipòtesi, s'han dut a terme tres estudis. A continuació es presenten les hipòtesis i els objectius globals de cada un dels estudis inclosos en aquesta memòria.

Estudi 1. L'estudi 1 comprèn els següents subestudis realitzats en la mateixa cohort:

- ✓ *Utilitat clínica de %[-2]proPSA i PHI en la detecció del càncer de pròstata*
- ✓ *La influència del volum prostàtic en el rendiment diagnòstic de PHI en pacients amb PSA < 10 µg/L*

Hipòtesi: La mesura de [-2]proPSA i PHI pot contribuir a la reducció del nombre de biòpsies negatives i, per altra banda, permetria identificar malalts amb CaP d'alt risc, disminuint així el sobrediagnòstic de CaP de baix risc de progressió.

Objectius de l'estudi:

- Avaluar la utilitat de %[-2]proPSA i PHI en la detecció del CaP.
- Estimar la relació de %[-2]proPSA i PHI amb l'agressivitat del CaP.
- Desenvolupar un model multivariat incorporant %[-2]proPSA i PHI per predir el CaP en pacients amb PSA < 10 µg/L.
- Avaluar la influència del volum prostàtic en el rendiment diagnòstic d'aquests models.

Estudi 2. L'estudi 2 comprèn el següent estudi:

- ✓ *Utilitat de la tècnica de real-time PCR per la determinació de PCA3 orina en la*

detecció del CaP.

Hipòtesi: La mesura del gen *PCA3* en orina recollida després de massatge prostàtic esdevé una tècnica útil per millorar l'eficàcia en el diagnòstic del CaP. A més, l'índex de *PCA3* pot contribuir a distingir entre pacients amb CaP de baix o alt risc, reduint el sobrediagnòstic de càncers de baix risc de progressió.

Objectius de l'estudi:

- Avaluar la utilitat de l'índex de *PCA3* en la detecció del CaP.
- Estimar la relació de l'índex de *PCA3* amb l'agressivitat del CaP.

Estudi 3. L'estudi 3 comprèn el següent estudi:

- ✓ *miARNs urinaris exosomals i no exosomals en la detecció i pronòstic del CaP.*

Hipòtesi: La detecció de certs microARNs en sediments i en exosomes en orina recollida després de massatge prostàtic esdevé una tècnica útil per millorar l'eficàcia en el diagnòstic del CaP. A més, els microRNAs poden contribuir a distingir entre pacients amb CaP de baix o alt risc, reduint el sobrediagnòstic dels càncers de baix risc de progressió.

Objectius de l'estudi:

- Estudiar el potencial de 5 miARNs associats a CaP: miR-21, miR-141, miR-214, miR-375 i let-7c en els sediments i exosomes urinaris com a biomarcadors per la detecció del CaP.
- Estudiar el potencial de 5 miARNs associats a CaP: miR-21, miR-141, miR-214, miR-375 i let-7c en els sediments i exosomes urinaris com a biomarcadors pronòstics del CaP.

DISCUSSIÓ

La detecció precoç del CaP en l'era del PSA ha comportat nous reptes per a l'avaluació clínica i la selecció del tractament. El *U.S. Preventive Services Task Force* va presentar noves recomanacions controvertides sobre l'ús de PSA en el cribratge del CaP, explicant una mínima o nul·la reducció en la mortalitat específica per CaP, i els danys relacionats amb l'avaluació i tractaments posteriors, alguns dels quals serien innecessaris (254). Certament, la detecció del CaP té dos reptes en relació amb l'elevat nombre de biòpsies negatives i l'elevada proporció de pacients diagnosticats amb tumors poc agressius. En el curs dels últims anys s'han introduït nous biomarcadors per a la detecció precoç del CaP, oferint una millora en la detecció i essent alguns d'ells útils en la diferenciació entre CaP agressiu i no agressiu. En aquesta tesi presento resultats referents als biomarcadors analitzats en sèrum (PHI, [-2] proPSA) i en orina (*PCA3*, en sediments; miARNs, en sediments i exosomes).

En el primer estudi d'aquesta tesi es presenten resultats sobre la utilitat de %[-2] proPSA i PHI en 354 pacients, dels quals 175 amb CaP. Els resultats obtinguts confirmen els resultats publicats prèviament relacionats amb aquests dos biomarcadors, demostrant que el rendiment diagnòstic en la detecció del CaP de %[-2] proPSA i PHI és superior al del PSA total i %fPSA. Així per exemple, l'estudi multicèntric de Stephan et al. va mostrar AUCs de 0,72 i 0,74 per %[-2] proPSA i PHI, respectivament (109). També l'estudi multicèntric i prospectiu de Lazzeri et al. (110) va obtenir una AUC de 0,67 per ambdós biomarcadors.

El rendiment diagnòstic de PHI i %[-2] proPSA obtingut en el nostre estudi fou molt similar, mostrant AUCs de 0,732 i 0,723, respectivament, per a les dues proves. Malgrat això, en el nostre estudi, el guany en el rendiment predictiu de %[-2] proPSA i PHI no fou significatiu en comparació amb %fPSA (AUC: 0,705). Lazzeri et al. (110) tampoc trobaren diferències entre els valors d'AUC de %[-2] proPSA (0,67) i PHI (0,67) i l'AUC de % fPSA (0,64). En canvi, segons Stephan et al. (109), les AUCs obtingudes per %[-2] proPSA (0,72) i PHI (0,74) superaren significativament la del %fPSA (0,61). La comparació de l'especificitat obtinguda per un valor discriminant corresponent al 90% de sensibilitat revela que l'especificitat de PHI en el nostre estudi és més alta que l'especificitat dels altres tests, incloent %[-2] proPSA i %fPSA (27,4% per PHI; 16,2% per %[-2] proPSA; i 17,9% per %fPSA). En conseqüència, el percentatge de biòpsies estalviades fou del 19% per PHI, del 12,7% per %[-2] proPSA i del 13,8% per %fPSA utilitzant valors discriminants de 31,94, 1,21 i 26,41, respectivament. Els nostres resultats van ser similars als reportats per Lazzeri et al. (110), els quals obtingueren una reducció de les biòpsies del 17% i 15,5% amb l'ús de %[-2] proPSA (valor discriminant: 1,22) i PHI (valor discriminant: 27,6), respectivament. Vam trobar resultats comparables

analitzant els pacients amb concentracions de PSA en la zona grisa (1,6-8 µg/L de PSA), encara que amb una especificitat menor per PHI, %[-2] proPSA i %fPSA en aquest grup de pacients (22,1, 11,8, i 11,8, respectivament). Les AUCs per PHI (0,729) i %[-2] proPSA (0,715) foren només lleugerament més baixes en aquests pacients que en el grup global (0,732 i 0,723 per PHI i %[-2] proPSA, respectivament).

La reducció de les biòpsies és un punt clau que justifica l'ús de %[-2] proPSA i PHI per tal de reduir la morbiditat així com per reduir els costos econòmics relacionats amb la biòpsia. Segons Nichol et al. (120), tot i que el cost de la mesura de %[-2] proPSA és 2-3 vegades més gran que el de la mesura de PSA total i fPSA, l'ús de %[-2] proPSA i PHI per a la detecció del CaP disminueix els costos globals, ja que el cost de la prova de sang addicional es compensa amb l'estalvi en els costos de les visites al consultori mèdic i l'estalvi de biòpsies innecessàries.

En el primer estudi d'aquesta tesi, també vam avaluar %[-2] proPSA i PHI en pacients de la mateixa cohort que el primer estudi però amb concentracions sèriques de PSA inferior a 10 µg/L mitjançant una anàlisi univariada i multivariada, aquesta última incloent un model de regressió logística i una xarxa neuronal artificial. L'anàlisi univariada mostrava resultats similars als dels estudis publicats, obtenint la major AUC per PHI (0,748). A més, vam trobar una associació de %[-2] proPSA i PHI amb el grau de Gleason de la biòpsia, com s'havia descrit en estudis previs (109,110,113,255). Segons les nostres dades, PHI no està relacionat amb el volum prostàtic en pacients amb biòpsia negativa, mentre que aquesta associació sí que s'observa per als altres biomarcadors. En contrast, en pacients amb CaP, es trobaren diferències significatives per a tots els biomarcadors, exceptuant el PSA total. Per tant, els nostres resultats remarquen diferències en el rendiment diagnòstic per aquests biomarcadors en relació al volum prostàtic. El rendiment diagnòstic de PHI varià en relació al volum prostàtic, amb AUCs de 0,818, 0,716 i 0,654 per pacients amb volums prostàtics petits (≤ 35 cm³), mitjans (36-50 cm³) i grans (> 50 cm³), respectivament. Aquests resultats no concorden amb resultats reportats prèviament per Catalonia et al. (255), els quals indicaren que PHI no està associat amb el volum prostàtic, amb AUCs similars per pacients amb volum prostàtic ≤ 38 cm³ (0,693), 39–53 cm³ (0,707) i ≥ 54 cm³ (0,642). No tenim explicació per aquests resultats discordants, encara que la mediana del volum prostàtic en pacients amb biòpsia negativa fou superior en el nostre estudi (64,25 vs 51 cm³). Recentment, Stephan et al. (256) avaluaren la densitat de PHI (incloent el volum prostàtic) en un estudi amb 118 pacients. Comparat amb el PSA (AUC 0,52), la densitat de PSA (AUC 0,70), %fPSA (AUC 0,75), i

PHI (AUC 0,76), la densitat de PHI demostrà la major capacitat de distingir el CaP clínicament significant amb una AUC de 0,84. Tot i així, són necessaris més estudis per confirmar el rendiment més alt de PHI en pacients amb volums prostàtics petits. En tot cas, com veurem, diversos models multivariats inclouen el volum de la pròstata en el seu càlcul.

La combinació de múltiples biomarcadors per a la detecció del CaP fou proposada per Mikolajczyk et al. (126) el 2004, tenint en compte que això reflecteix la naturalesa multidimensional de la malaltia de la pròstata, que va des del càncer metastàtic a la HBP i la inflamació. Els nostres resultats demostren aquest fet, amb la millora del rendiment diagnòstic en la detecció de CaP a l'emprar un model multivariat, en particular quan s'inclou el volum prostàtic.

Mitjançant corbes de decisió analítica, hem demostrat que l'ús de models que incloïen PHI i %[-2] proPSA pot millorar de forma important la precisió obtinguda amb un model base. Sokoll et al. (111) suggeriren l'ús d'un model multivariat, obtenint una AUC de 0,76 per als pacients amb concentracions sèriques de PSA entre 2 i 10 µg/L. Aquest model incloïa PSA total, %fPSA i %[-2] proPSA, juntament amb diversos factors clínics i demogràfics, però no el volum de la pròstata. També, Stephan et al. (112) van proposar un model multivariat, construït per mitjà de regressió logística i xarxes neuronals artificials, indicant que no hi havia millora quan el volum prostàtic s'inclouïa en el model. No obstant, un segon estudi realitzat per Stephan et al. (109) millorava el rendiment diagnòstic de la detecció del CaP afegint %[-2] proPSA (AUC: 0,75) o PHI (AUC: 0,75) a un model multivariat basat en l'edat del pacient, el volum de la pròstata, el tacte rectal, el PSA total i %fPSA (AUC: 0,69). També es va incloure el volum prostàtic en el model multivariat descrit per Guazzoni et al. (113) mostrant un guany en la precisió predictiva de 0,10 o 0,11, respectivament, quan %[-2] proPSA (AUC: 0,82) o PHI (AUC: 0,83) s'afegien a un model base que incloïa l'edat del pacient, el volum de la pròstata, PSA total i %fPSA (AUC: 0,72).

En el nostre estudi s'observen algunes diferències en relació amb resultats publicats anteriorment. Nosaltres obtinguérem una major AUC per al model base, el qual incloïa l'edat del pacient, el volum de la pròstata, PSA total i % fPSA (0,762), probablement perquè l'AUC per al %fPSA és major en el nostre estudi: 0,70 enfront de 0,61 reportat per Stephan et al. (109), i 0,58 reportat per Guazzoni et al. (113). No obstant, els nostres resultats són comparables amb els resultats publicats quan %[-2] proPSA i PHI s'afegiren al model base, obtenint un guany similar (0,053 i 0,040, utilitzant regressió logística i xarxa neuronal artificial,

respectivament) als reportats per Stephan et al. (109) (0,06, incloent %[-2] proPSA o PHI) i Guazzoni et al. (113) (0,10 i 0,11, incloent %[-2] proPSA i PHI, respectivament). El nostre estudi posa en relleu el significat del volum prostàtic en la interpretació dels biomarcadors del CaP. Les AUC obtingudes mitjançant una anàlisi multivariada foren inferiors per a tots els models quan s'excloïa el volum prostàtic. A més, observàrem diferències en les corbes ROC segons el volum de la pròstata, obtenint el major rendiment per a tots els biomarcadors en pacients amb volum prostàtic petit. Els resultats remarquen la relació de PHI amb el volum de la pròstata en pacients amb CaP, però no en pacients amb biòpsia negativa. Aquest és un tret característic de PHI oposat als altres biomarcadors avaluats en aquest estudi, en concret PSA total, %[-2] proPSA i %fPSA. D'altra banda, en pacients amb CaP, els valors de PHI van ser significativament superiors en els pacients amb un volum de la pròstata petit que en els pacients amb pròstates mitjanes o grans.

En conclusió, la precisió per detectar CaP millorava quan s'inclouïa PHI o %[-2] proPSA en el model multivariat, obtenint AUCs de 0,802 i 0,815 utilitzant una anàlisi de regressió logística o una xarxa neuronal artificial, respectivament. No obstant, el volum prostàtic és un factor clau en la interpretació dels biomarcadors utilitzats per detectar CaP.

El valor de %[-2] proPSA i PHI és particularment important per la relació d'aquests biomarcadors amb el CaP agressiu. La disponibilitat de biomarcadors d'agressivitat és un punt clau ja que una proporció substancial de nous tumors diagnosticats són clínicament insignificants i aquests pacients poden ser candidats a vigilància activa (257). L'estudi PIVOT (Prostate Cancer Intervention versus Observation Trial) (258) es realitzà en 731 homes amb CaP localitzat que foren assignats aleatòriament a un tractament de prostatectomia radical o a observació i seguits durant 12 anys. No es trobaren reduccions significatives de la mortalitat entre els pacients tractats amb prostatectomia radical en comparació amb els pacients sotmesos a observació. Els resultats reportats en l'estudi PIVOT posen de manifest la utilitat dels factors de risc en el maneig de pacients amb CaP per tal de seleccionar apropiadament si s'han de sotmetre a tractament radical o a vigilància activa. Tosoian et al. (124) suggeriren que en els homes en vigilància activa, PHI sembla proporcionar una millor predicció de la reclassificació de biòpsia durant el seguiment.

Diversos autors han demostrat que %[-2] proPSA i PHI estan relacionats amb l'agressivitat del CaP, amb resultats superiors d'aquests biomarcadors en pacients amb un grau de Gleason de 7 o superior i en pacients amb tumors localment avançats (111-113, 122). En el nostre

estudi advertírem que %[-2] proPSA i PHI estan en quantitats significativament més elevades en pacients amb grau de Gleason de la biòpsia igual o superior a 7. En canvi, no es van observar diferències entre aquests grups de pacients en relació amb %fPSA. També hi hagué associació entre quantitats elevades de %[-2] proPSA i PHI i estadis clínics T2-3. Resultats similars foren publicats per Stephan et al. (109) i Lazzeri et al. (110). Per tant, %[-2] proPSA i PHI són útils particularment en la detecció de CaP agressiu, mostrant el millor rendiment diagnòstic en la detecció d'aquests tumors. En la població estudiada, les AUCs obtingudes en la comparació de pacients amb biòpsia negativa i CaP amb grau de Gleason ≥ 7 van ser de 0,833 i 0,813 per PHI i %[-2] proPSA, respectivament. Aquest és un punt important tenint en compte els dubtes sobre si els pacients amb CaP amb grau de Gleason de 6 haurien de considerar-se realment càncers (19). A causa de l'associació de %[-2] proPSA i PHI amb el grau de Gleason de la biòpsia, és necessari remarcar que els resultats obtinguts en el nostre estudi podrien estar influenciats per l'elevat percentatge de pacients amb grau de Gleason inferior a 7. El guany en les AUCs per %[-2]proPSA (de 0,723 a 0,813) i PHI (de 0,732 a 0,833) fou superior al guany en les AUCs per %fPSA (de 0,705 a 0,753) quan comparàrem l'anàlisi de corbes ROC considerant tots els pacients, amb l'anàlisi de corbes ROC considerant els pacients amb biòpsia negativa enfront els pacients amb CaP i un grau de Gleason de la biòpsia ≥ 7 .

En resum, PHI resultà ser el millor paràmetre per predir CaP en el nostre estudi basat en resultats de 354 pacients, amb associació entre %[-2] proPSA i PHI i l'agressivitat del tumor. Els nostres resultats confirmen resultats d'estudis previs, amb AUCs i resultats de sensibilitat i especificitat similars, encara que el rendiment diagnòstic de %fPSA és lleugerament superior que en altres estudis. Nosaltres suggerim l'ús d'un valor discriminant de 32 per PHI i 1,21 per %[-2] proPSA, corresponents a una sensibilitat del 90% en la nostra cohort. Malgrat que altres autors han indicat valors discriminants similars, són necessaris estudis multicèntrics per tal de definir el valor discriminant més adequat per ambdós biomarcadors. La implementació d'aquests biomarcadors a la pràctica clínica milloraria la precisió en la detecció del CaP, reduint així el nombre de biòpsies innecessàries i millorant la predicció de l'agressivitat del tumor.

L'estudi de nous biomarcadors en orina s'ha intensificat en els últims anys amb l'objectiu de millorar l'eficàcia del diagnòstic del CaP i la predicció del pronòstic. L'orina presenta avantatges respecte al sèrum o al plasma, ja que els biomarcadors produïts per les cèl·lules canceroses van directament a l'orina, on estan diluïts en un volum més petit. La mesura

d'aquests biomarcadors és particularment interessant quan la mostra s'obté després d'un massatge prostàtic, per tal d'augmentar la quantitat de material prostàtic (259). Segons Sokoll et al. (260), les mostres obtingudes després d'un massatge prostàtic proporcionen una taxa informativa del 95,5%, mentre que les orines de primera hora del matí i les mostres obtingudes abans del massatge prostàtic tenen taxes marcadament més baixes (80,4% i 74,4%, respectivament).

En el tercer estudi d'aquesta tesi, analitzarem la capacitat de l'índex PCA3 de predir el resultat de la biòpsia en mostres d'orina obtingudes després d'un massatge prostàtic de 122 pacients amb concentracions sèriques de PSA d'entre 4 i 20 µg/L. Trobarem que la probabilitat de CaP estava relacionada amb l'índex PCA3, amb resultats que anaven des del 36,8% quan l'índex de PCA3 era $\leq 0,90$, al 96,4% quan l'índex de PCA3 era $> 1,04$.

En el nostre estudi, obtinguérem un rendiment diagnòstic elevat, amb una AUC de 0,804. Els valors d'AUC publicats per a PCA3 oscil·len entre 0,60 i 0,90 (261, 262), sense diferències entre el test semiautomatitzat de ProgenSA™, aprovat per la FDA, i les tècniques de qRT-PCR. Diversos estudis publicats en els darrers anys mostren el valor clínic de PCA3 en la detecció del CaP, que supera l'especificitat del PSA i també del %fPSA en la majoria dels casos. El nostre estudi subratlla que l'índex de PCA3 té un rendiment diagnòstic superior al del PSA (AUC: 0,587) i del %fPSA (AUC: 0,697), malgrat que només es trobaren diferències significatives entre PCA3 i PSA total. Aquests resultats estan en concordança amb la major part dels estudis publicats (83, 263-266), però difereixen dels resultats publicats per Auprich et al. (267) que mostraren un millor rendiment diagnòstic del %fPSA en el grup de pacients amb dos o més biòpsies prèvies negatives. En la nostra experiència, el rendiment de l'índex de PCA3 fou independent de la concentració sèrica de PSA, essent les AUCs molt similars en el grup de pacients amb concentracions de PSA entre 4 i 10 µg/L (0,793) i en el grup de pacients amb PSA entre 10,1 i 20 µg/L (0,821). D'altra banda, no vam trobar diferències significatives per pacients sotmesos a primera biòpsia (AUC: 0,764), o biòpsia repetida a causa d'un resultat negatiu previ (AUC: 0,816). Ambdós punts coincideixen amb les conclusions reportades per Bradley et al. (80) en una revisió comparativa, en què analitzaren 24 estudis observacionals adreçats a avaluar l'eficàcia diagnòstica de l'índex de PCA3.

Com hem explicat a la introducció d'aquesta tesi, un dels punts més controvertits sobre l'índex de PCA3 és la definició del valor discriminant que s'ha d'utilitzar per detectar el CaP amb una adequada sensibilitat i especificitat. Quan s'usa el test comercial de ProgenSA™, el

valor discriminant més comú és 35, malgrat que el recomanat per la FDA és 25. Tot i així, Capoluongo et al. (85) obtingueren el millor rendiment diagnòstic utilitzant un valor discriminant de 20, amb una sensibilitat del 95,4% i especificitat del 30,9%. El principal inconvenient de fer servir una tècnica manual per mesurar l'índex de PCA3, com en l'estudi que es presenta, és que el valor discriminant ha de ser definit sense cap referència sobre l'experiència obtinguda amb la mesura de PCA3 pel reactiu comercial de ProgenSA™. En aquest estudi vam escollir un valor discriminant de 0,90 per tal de reduir al mínim el nombre de resultats falsos negatius. Amb l'ús d'aquest valor discriminant, la sensibilitat va ser del 92,5% i l'especificitat del 41,4%. Resultats similars en especificitat han estat reportats per altres autors usant valors discriminants corresponents a una sensibilitat del voltant del 90% (84,268,269). Mitjançant qRT-PCR, amb una sensibilitat del 90%, Rigau et al. (270) van trobar una especificitat del 25%, mentre que Salami et al. (268), per a una sensibilitat del 93%, van trobar una especificitat del 37%. D'altra banda, Crawford et al. (84) i Rubio-Briones et al. (271), utilitzant la prova de PCA3 de ProgenSA™, documentaren especificitats de 36,6% i 33% per a sensibilitats de 86,5% i 85%, respectivament. També, Chun et al. (269), utilitzant la prova de PCA3 de ProgenSA™, van trobar una especificitat del 45% per a un valor discriminant de 17, corresponent a una sensibilitat del 81,3%.

Per tal de seleccionar millor els pacients amb CaP candidats a un programa de vigilància activa, és necessari disposar de biomarcadors d'agressivitat. Ferro et al. (265), avaluaren el rendiment de la prova PCA3 ProgenSA™ en 300 pacients, i suggeriren que els pacients amb CaP candidats a vigilància activa tenien valors d'índex de PCA3 significativament més baixos. No obstant, i com ja hem explicat a la introducció d'aquesta tesi, la relació de l'índex de PCA3 amb l'agressivitat del tumor és un punt controvertit, amb estudis que suggereixen aquesta relació (85-87), i altres que conclouen que no existeix relació de l'índex de PCA3 amb el grau de Gleason o l'estadi clínic o patològic (88-90). Els nostres resultats no mostren evidència de la correlació de l'índex de PCA3 amb el grau de Gleason ni amb l'estadi clínic o el patològic.

Els resultats presentats en aquest estudi són encoratjadors, però tenen diverses limitacions. És important assenyalar que les nostres dades, i la de la majoria dels estudis publicats sobre PCA3, són realitzats en pacients seleccionats per biòpsia d'acord amb la concentració sèrica de PSA. En el nostre estudi es van analitzar pacients amb concentracions de PSA entre 4 i 20 µg/L. Les diferències en les AUCs entre l'índex de PCA3 i PSA probablement serien menors si els pacients se seleccionessin minimitzant el biaix causat per la influència de PSA

en la seva selecció. D'altra banda, tot i que els resultats inicials suggereixen que PCA3 se sobreexpressa en el teixit amb CaP, es detectaren resultats falsos negatius en el nostre estudi, incloent entre ells dos pacients amb grau de Gleason de la biòpsia de 9.

Els resultats presentats en aquest estudi utilitzant una tècnica de qRT-PCR són comparables als resultats publicats utilitzant la tècnica de ProgenSATM per mesurar PCA3 aprovada per la FDA. La tècnica de qRT-PCR és de fàcil realització i baix preu amb un ús potencial per la detecció del CaP, mostrant els pacients amb un índex de PCA3 elevat una probabilitat alta de càncer. En conclusió, l'índex de PCA3 podria millorar la predicció de CaP i ajudar a seleccionar millor els pacients candidats a biòpsia. Tanmateix, la seva discutida relació amb l'agressivitat del tumor, tal i com apunten els resultats obtinguts en aquesta tesi, constitueix un punt de dubte sobre la seva utilitat.

En el quart estudi d'aquesta tesi, s'analitzà l'expressió de 5 miARNs en sediments urinaris de 60 pacients amb CaP i 10 controls sans. A més a més, aquests miARNs també els vam estudiar en exosomes aïllats de l'orina de 52 d'aquests pacients amb CaP i de tots els controls sans. Vam observar que miR-21, miR-141 i miR-375 es trobaven significativament sobreexpressats en els sediments dels pacients amb CaP mentre que miR-214 estava significativament infraexpressat. Suggerim un perfil combinat de miR-21 i miR-375 com la millor combinació per distingir els pacients amb CaP i els controls sans, amb una AUC de 0,872. Quan estudiàrem l'expressió dels mateixos miARNs en els exosomes urinaris, vam confirmar que l'expressió de miR-21 i miR-375 també estava significativament elevada en els pacients amb CaP. No es trobaren diferències significatives per miR-141 i miR-214 en exosomes comparant ambdós grups, però sí una tendència a la sobreexpressió per miR-141. Let-7c, per altra banda, estava significativament sobreexpressat en exosomes, però no en els sediments.

Els miARNs urinaris amb potencial diagnòstic per la identificació del CaP s'han reportat en diversos estudis previs, i en diverses fraccions de l'orina (272,273). Les nostres dades concorden amb els resultats publicats recentment per Stupelytė et al. (274), que mostraren quantitats de miR-21 majors en sediments urinaris de pacients amb CaP que en pacients amb HBP. També concorden amb els resultats obtinguts per Srivastava et al. (212), els quals trobaren que miR-214 estava infraexpressat en mostres d'orina total en pacients amb CaP comparat amb controls sans. Segons Ahumada-Tamayo et al. (215), let-7c està sobreexpressat en sediments urinaris de pacients amb CaP respecte pacients amb HBP. En

L'estudi que es presenta, en canvi, només es trobaren diferències significatives per let-7c en exosomes urinaris i no en sediments. Contràriament als nostres resultats, Bryant et al. (214) no van trobar diferències significatives per miR-375 ni per miR-141 en sediments urinaris comparant pacients amb CaP i controls benignes. Les diferències en la metodologia podrien explicar els resultats contradictoris entre els diversos estudis (205).

En realitat són pocs els investigadors que han estudiat els miARNs en exosomes urinaris en pacients amb CaP fins al moment. Per una banda, Bryzgunova et al. (251) han mostrat recentment resultats prometedors per la detecció del CaP amb l'anàlisi de miR-19b en exosomes urinaris aïllats per centrifugació diferencial. Per una altra banda, Samsonov et al. (252) van trobar que miR-21, miR-141 i miR-574 estaven sobreexpressats en pacients amb CaP en comparació amb controls sans en exosomes urinaris aïllats per mitjà d'un mètode d'aglutinació basat en lectina. No obstant, només miR-141 es va trobar significativament sobreexpressat quan els exosomes urinaris s'aïllaren per mitjà de la centrifugació diferencial.

Els nostres resultats suggereixen el valor dels exosomes urinaris per la detecció del CaP, malgrat que les AUCs foren en general inferiors a les obtingudes en els sediments urinaris. Els nostres resultats confirmen les dades mencionades sobre miR-21 i subratllen el valor de miR-21 i miR-375, amb AUCs de 0,713 i 0,799, respectivament. Les diferències metodològiques en l'aïllament dels exosomes podrien explicar els resultats discordants en relació a dades prèviament publicades sobre miR-141. A més, és necessari realitzar estudis multicèntrics en orina basats en tècniques de *microarrays* o NGS per tal de seleccionar millor els miARNs implicats en la patogènesi del CaP.

D'altra banda, els miARNs analitzats en aquest estudi s'han trobat significativament desregulats en estudis previs tant en el sèrum/plasma com en exosomes circulants de pacients amb CaP. Per exemple, Cheng et al. (275) van observar una sobreexpressió significativa de miR-141 i miR-375 circulants amb AUCs de 0,842 i 0,660, respectivament, comparant pacients amb CRPC i els controls sans. De la mateixa manera, Mitchell et al. (204) van trobar una sobreexpressió significativa de miR-141 en sèrum de pacients amb CaP metastàtic en comparació amb controls sans, amb una AUC de 0,907. Yaman Agaoglu et al. (276) van obtenir una AUC de 0,88 per miR-21, trobant quantitats més altes en plasma de pacients amb CaP enfront dels controls sans. Selth et al. (277) també trobaren nivells més alts de miR-141 i miR-375 en plasma de pacients amb CRPC comparat amb els d'individus sans. Li et al.

(278) van estudiar miARNs en exosomes de sèrum de pacients amb CaP i controls sans i van trobar que miR-375 i miR-21 estaven sobreexpressats en CaP.

Les dades publicades en relació amb el valor de miARNs per predir l'agressivitat del CaP són contradictòries. Stephan et al. (220) no trobaren associació de miR-183 i miR-205 amb el grau de Gleason ni la concentració sèrica de PSA. En canvi, Sapre et al. (213) van mostrar que diversos miARNs, incloent miR-21 i miR-375, es trobaven sobreexpressats en pacients amb CaP d'alt risc. Els autors van seleccionar un perfil de miARNs que combina miR-16, miR-21, i miR-222 per predir CaP d'alt risc. No obstant, els resultats no es van confirmar quan aquest perfil es va validar en una cohort independent de pacients. D'altra banda, Lewis et al. (183) van trobar diferències significatives comparant els pacients amb un grau de Gleason superior a 8, i els pacients amb graus de Gleason més baixos per miR-888, miR-34a, miR-205, let-7c, let-7d, miR-200b, miR-92a, miR-99a, miR-141 i miR-375. En el nostre estudi observarem una associació significativa de l'expressió de miR-141 en sediment urinari amb el grau de Gleason, mentre que en exosomes urinaris, let-7c mostrà nivells significativament més baixos en pacients amb estadi clínic T2-3. No obstant, no es van trobar diferències significatives per a altres miARNs. També vam estudiar si hi havia associació entre l'expressió dels diversos miARNs i els grups de risc de D'Amico, comparant els pacients amb risc intermedi i alt enfront dels pacients de baix risc juntament amb els subjectes sans. Trobàrem diferències significatives en els sediments urinaris entre ambdós grups per miR-21, miR-141 i miR-214, mentre que per miR-375 hi havia certa tendència encara que no significativa ($p=0,098$). En els exosomes, es va observar que l'expressió de miR-21 i miR-375 fou superior en els grups amb CaP de risc intermedi/alt, i la mateixa tendència per miR-141 ($p=0,055$). Finalment, observarem un patró irregular dels nivells d'expressió de let-7c, mostrant nivells superiors en el grup de CaP de baix risc que en els altres grups.

Els nostres resultats preliminars suggereixen que els miARNs en orina poden distingir el CaP agressiu del no agressiu. Huang et al. (250) van demostrar que nivells d'expressió elevats de miR-375 i miR-1290 en exosomes aïllats de plasma estaven associats significativament amb una supervivència disminuïda en pacients amb CRPC. Wang et al. (279) proposaren un perfil de miARNs que combinava miR-19, miR-345 i miR-519c-5p en sèrum per predir la patologia adversa en pacients amb CaP candidats a vigilància activa. No obstant, són necessaris més estudis per demostrar el valor dels miARNs de predir l'agressivitat del CaP.

D'acord amb les nostres dades, miR-21 i miR-375 tenen valor diagnòstic i pronòstic, fet que suggereix la seva utilitat per avaluar els pacients amb CaP. MiR-21 es troba normalment sobreexpressat en CaP en estadis inicials i també en càncer metastàtic (280,281), i juga un paper crucial en la carcinogènesi. Contribueix al creixement del tumor, la invasivitat, la resistència als andrògens i la metastasi a través de diverses vies (194,281,282). D'una banda, miR-21 regula directament el gen *PTEN*, reduint significativament l'apoptosi i promovent l'angiogènesi a través de la via de senyalització *HIF-1 α* (283,284). A més, la sobreexpressió de miR-21 en el CaP també participa en la transició epiteli-mesenquimal, disminuint els nivells de *BTG2* i la afavorint l'adquisició de marcadors luminals (194,285). També s'ha demostrat que miR-21 i el gen del receptor d'andrògens (*AR*) es regulen mútuament en un bucle de retroalimentació positiva. Ribas et al. (286) van reportar que *AR* actua com un regulador directe de la transcripció i s'uneix a un promotor definit de miR-21, miPPR-21, donant com a resultat la sobreexpressió de miR-21, fet que intensifica el creixement del CaP dependent d'andrògens. Per altra banda, l'expressió anormal de miR-375 en el CaP s'ha implicat en un augment de la migració i la invasió del tumor. Recentment, Pickl et al. (287) identificaren *CBX7* (*Polycomb repressive complex I member*) com una diana de miR-375 clau per la progressió del CaP. La inhibició de *CBX7* per miR-375 condueix a l'activació dels programes de transcripció relacionats amb la progressió maligna. A més, el miR-375 també té un paper en la transició epiteli-mesenquimal, a través d'una xarxa formada per *ZEB1*-miR-375-*YAP1*, afavorint la invasió i la metastasi (288). La participació de miR-21 i miR-375 en vies de senyalització claus remarca, per tant, la seva utilitat com a biomarcadors de CaP. D'acord amb els nostres resultats, tots dos biomarcadors es troben sobreexpressats en pacients amb CaP de risc intermedi i alt, fet que suggereix la seva participació en la progressió del CaP.

En resum, les dades presentades en aquest últim estudi són optimistes. Els miARNs tenen la particularitat -a diferència de la resta de biomarcadors avaluats en aquesta tesi- de participar en la patogènesi del CaP. No obstant, són necessàries l'optimització i l'estandardització de la metodologia utilitzada per a la seva anàlisi per tal d'obtenir resultats d'alta qualitat. A més, es requereixen mètodes més eficaços per l'aïllament d'exosomes en fluids corporals. Els exosomes urinaris i la seva càrrega són una font de biomarcadors que reflecteixen la comunicació intercel·lular en relació amb el tumor. Els miARNs, especialment miR-21 i miR-375, emergeixen com biomarcadors per la detecció i el pronòstic del CaP.

Per valorar conjuntament la utilitat dels biomarcadors estudiats en aquesta tesi seria necessari

disposar de resultats de tots ells en una mateixa població. Malauradament, no disposem d'aquestes dades i aquesta és probablement una limitació important per oferir conclusions amb un major grau de validesa. Tampoc, per altra banda, no hi ha estudis que comparin tots aquests biomarcadors i tan sols disposem de comparacions parcials que, per altra banda, no ofereixen resultats concloents.

Així, per exemple, Scattoni et al. (289) van comparar la utilitat de l'índex de PCA3 i PHI en 211 pacients sotmesos a biòpsia de pròstata inicial (n=116) o de repetició a causa d'una biòpsia negativa prèvia (n=95), trobant que PHI tenia un rendiment diagnòstic significativament superior a l'índex de PCA3 per predir CaP (AUC 0,70 vs 0,59). No obstant, Stephan et al. (266) van avaluar 246 pacients, i no trobaren diferències significatives en el rendiment diagnòstic entre l'índex de PCA3 i PHI (AUC 0,74 vs 0,68), mentre que el gen de fusió *TMPRSS2:ERG* en orina no va millorar significativament la capacitat de detectar CaP. D'altra banda, només el PSA i PHI correlacionaren amb el grau de Gleason, mentre que l'índex de PCA3, %fPSA i *TMPRSS2:ERG* no mostraren correlació. Contràriament, en un altre estudi, Tallon et al. (290) van concloure que PHI, *PCA3* i el gen de fusió *TMPRSS2:ERG* són predictors complementaris de l'agressivitat del càncer en el moment de la prostatectomia radical. Segons aquest grup, l'índex de PCA3 es relaciona amb un volum del tumor $\geq 0,5 \text{ cm}^3$ i amb la multifocalitat del tumor, mentre que PHI es relaciona amb un volum del tumor $\geq 0,5 \text{ cm}^3$, el grau de Gleason ≥ 7 i l'extensió extracapsular. Finalment, el gen de fusió *TMPRSS2:ERG* només estava relacionat amb l'estadi patològic.

Una comparació entre l'índex 4K i PHI el proporcionaren Nordström et al. (117) avaluant el rendiment diagnòstic d'aquests biomarcadors en una sèrie de 531 homes amb concentracions sèriques de PSA d'entre 3 i 15 $\mu\text{g/L}$. No es van trobar diferències significatives entre ambdós biomarcadors en la detecció de CaP, ni tampoc en la detecció de CaP d'alt grau (AUCs: 0,69 i 0,718, respectivament, per l'índex 4K; i 0,704 i 0,711, respectivament, per PHI). D'altra banda, Vedder et al. (291) compararen *PCA3* i l'índex 4K en 708 pacients en els quals la biòpsia es realitzà quan la concentració de PSA era $\geq 3 \mu\text{g/L}$ o l'índex de PCA3 era ≥ 10 . L'índex 4K supera l'índex de PCA3 (AUC 0,78 vs 0,62) en els homes amb concentracions de PSA elevades, tot i que el rendiment de l'índex de PCA3 fou superior en la població global (AUC 0,63 per PCA3 vs 0,56 per l'índex 4K). A més, els autors van mostrar que les dues proves augmentaren el valor d'un model base multivariat (de 0,70 a 0,73 afegint l'índex de PCA3, i a 0,71 afegint l'índex 4K), encara que només hi havia diferències significatives quan s'afegia l'índex de PCA3 ($p = 0,02$).

Per una altra banda, Cantiello et al. (292) van realitzar un estudi comparatiu de la precisió pronòstica de PHI i el gen *PCA3* per a la predicció de característiques patològiques en una cohort de pacients amb CaP sotmesos a prostatectomia radical. PHI resultà significativament millor que l'índex de *PCA3* per predir la presència de CaP agressiu i disseminat. Els autors van trobar que tant PHI com *PCA3* milloraven significativament la precisió per predir l'extensió extracapsular en comparació amb el model base (el qual incloïa l'edat del pacient, PSA total, PSA lliure, % cilindres positius, estadi clínic, volum prostàtic, índex de massa corporal, grau de Gleason de la biòpsia). En el subgrup de pacients amb grau de Gleason inferior a 7, PHI millorava significativament el rendiment diagnòstic predictiu per predir CaP agressiu en comparació amb el model base (AUC de 0,973 enfront de 0,897). L'índex de *PCA3* no va afegir cap augment significatiu en el valor predictiu en aquest cas.

En resum, en els últims anys, s'han identificat nous biomarcadors de CaP, alguns d'ells relacionats amb l'agressivitat del tumor. Estudis prospectius multicèntrics han demostrat la utilitat de PHI, de l'índex 4K i de l'índex de *PCA3* per reduir el nombre de biòpsies prostàtiques innecessàries. Els resultats presentats en aquesta tesi coincideixen amb aquestes conclusions. De fet, aquests biomarcadors han estat recomanats per diverses guies (78,293,294). Tot i així, per disposar d'un major grau d'evidència seria necessari realitzar estudis prospectius que no tan sols incloguin una sèrie àmplia de pacients, sinó que també evitin el biaix causat per la preselecció dels pacients segons les concentracions sèriques de PSA. A més a més, també cal estandarditzar la metodologia per la mesura dels miARNs exosomals i no exosomals amb l'objectiu d'analitzar amb precisió la seva utilitat en l'avaluació dels pacients amb CaP. Finalment, cal estudiar a fons el valor diagnòstic i pronòstic d'aquests biomarcadors combinant els resultats de laboratori amb les dades d'imatge obtingudes per ressonància magnètica (295-297). Malgrat tot, tant els resultats aportats en aquesta tesi com els resultats publicats fins al moment per diversos grups mostren que tots aquests biomarcadors emergents poden ser una eina eficaç per detectar CaP i per distingir els pacients amb CaP agressiu i no agressiu.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. %[-2]proPSA i PHI són útils en la detecció del CaP i superen el rendiment diagnòstic de PSA total i %PSA lliure.
2. El percentatge de [-2]proPSA i PHI mostren associació significativa amb l'agressivitat del tumor.
3. La implementació d'aquests biomarcadors en la clínica milloraria la precisió en la detecció del CaP, reduint el nombre de biòpsies innecessàries i millorant la predicció de l'agressivitat del tumor.
4. La introducció de PHI i %[-2]proPSA millora el rendiment diagnòstic per la detecció del CaP d'un model multivariat que inclou PSA total, %PSA lliure, edat del pacient, volum prostàtic.
5. El volum prostàtic és un factor clau en la interpretació dels biomarcadors per detectar CaP.
6. L'índex de PCA3 és útil en la detecció de CaP, superant el rendiment diagnòstic de PSA total i %PSA lliure.
7. No es va trobar associació significativa de l'índex de PCA3 amb l'agressivitat del tumor.
8. MiR-21, miR-141, miR-214 i miR-375 analitzats en els sediments urinaris presenten diferències significatives comparant els grups de pacients amb CaP versus controls sans.
9. MiR-21, miR-375 i let-7c en exosomes urinaris presenten diferències significatives comparant els grups de pacients amb CaP versus controls sans.
10. MiR-21, miR-141 i miR-214 en sediments urinaris són capaços de distingir de manera significativa els grups de pacients amb CaP d'alt risc i intermedi versus els de baix risc i controls sans.
11. MiR-21, miR-375 i let-7c en exosomes urinaris són capaços de distingir de manera significativa els grups de pacients amb CaP d'alt risc i intermedi versus els de baix risc i controls sans.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359-86.
2. Pla contra el càncer de la Generalitat de Catalunya 2015-2020. <http://cancer.gencat.cat/web/.content/mery/documents/Pla-contra-el-cancer-a-Catalunya-vs-14-abril-2015.pdf>. Accés el 20/01/2017
3. Thanigasalam R, Rasiah KK, Stricker PD, Haynes AM, Sutherland SI, Sutherland RL, et al. Stage migration in localized prostate cancer has no effect on the post-radical prostatectomy Kattan nomogram. *BJU Int* 2010;105:642-7.
4. Cancer Facts & Figures 2016. American Cancer Society. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>
5. Lippi G, Montagnana M, Guidi GC, Plebani M. Prostate-specific antigen-based screening for prostate cancer in the third millennium: useful or hype? *Ann Med* 2009;41:480-9.
6. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, Brawer MK, Flanigan RC, Patel A, et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: A prospective multicenter clinical trial. *JAMA* 1998;279:1542-7.
7. Etzioni R, Penson DF, Legler JM, di Tommaso D, Boer R, Gann PH, et al. Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. *J Nat Cancer Inst* 2002;94:981-90.
8. Johansson JE, Andrén O, Andersson SO, Dickman PW, Holmberg L, Magnuson A, et al. Natural history of early, localized prostate cancer. *JAMA* 2004;291:2713-9.
9. Melichar B. PSA, PCA3 and the philosophy of prostate cancer management. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:707-12.
10. Stephan C, Jung K, Ralla B. Current biomarkers for diagnosing of prostate cancer. *Future Oncol* 2015;11:2743-55.
11. Klotz, L. Low-risk prostate cancer can and should often be managed with active surveillance and selective delayed intervention. *Nat Clin Pract Urol* 2008; 5: 2-3.
12. Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, Brendler CB. Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. *JAMA* 1994;271:368-74.
13. Bastian PJ, Mangold LA, Epstein JI, Partin AW. Characteristics of insignificant clinical T1c prostate tumors. A contemporary analysis. *Cancer* 2004;101:2001-2005
14. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Fondurulia J, Chen MH, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Wein A, Richie JP. Clinical utility of the percentage of

BIBLIOGRAFIA

positive prostate biopsies in defining biochemical outcome after radical prostatectomy for patients with clinically localized prostate cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18:1164-72.

15. Stanford JL, Feng Z, Hamilton AS, Gilliland FD, Stephenson RA, Eley JW, Albertsen PC, Harlan LC, Potosky AL. Urinary and sexual function after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer: the Prostate Cancer Outcomes Study. *JAMA*. 2000;283:354-60.

16. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening; diagnosis; and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur Urol* 2014; 65:124-137.

17. Palisaar JR, Noldus J, Löppenberg B, von Bodman C, Sommerer F, Eggert T. Comprehensive report on prostate cancer misclassification by 16 currently used low-risk and active surveillance criteria. *BJU Int* 2012; 110: E172-E181.

18. Rubin MA, Girelli G, Demichelis F. Genomic Correlates to the Newly Proposed Grading Prognostic Groups for Prostate Cancer. *Eur Urol* 2016; 69: 557-560.

19. Carter HB, Partin AW, Walsh PC, Trock BJ, Veltri RW, Nelson WG, et al. Gleason score 6 adenocarcinoma: Should it be labeled as cancer? *J Clin Oncol* 2012; 30: 4294-4296.

20. Kulac I, Haffner MC, Yegnasubramanian S, Epstein JI, de Marzo AM. Should Gleason 6 be labeled as cancer? *Curr Opin Urol* 2015; 25: 238-245.

21. Georgescu I, Gooding RJ, Doiron RC, Day A, Selvarajah S, Davidson C, Berman DM, Park PC. Molecular characterization of Gleason patterns 3 and 4 prostate cancer using reverse Warburg effect-associated genes. *Cancer Metab* 2016;4:8.

22. Ross-Adams H, Lamb AD, Dunning MJ, Halim S, Lindberg J, Massie CM, et al. Integration of copy number and transcriptomics provides risk stratification in prostate cancer: A discovery and validation cohort study. *EBioMedicine* 2015;2:1133-44.

23. Cancer Genome Atlas Research Network. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* 2015;163:1011-25.

24. You S, Knudsen BS, Erho N, Alshalalfa M, Takhar M, Al-Deen Ashab H, et al. Integrated Classification of Prostate Cancer Reveals a Novel Luminal Subtype with Poor Outcome. *Cancer Res* 2016;76:4948-58.

25. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979;17:159-63.

26. Sokoll LJ, Chan DW. Prostate-specific antigen: its discovery and biochemical characteristics. *Urol Clin North Am* 1997;24:253-259.

BIBLIOGRAFIA

27. Filella, X, Molina, Ballesta AM. PSA de origen extraprostático. Detección e implicaciones clínicas. A: Molina R, Ballesta AM, dirs. Biología y utilidad clínica de los marcadores tumorales. Barcelona, 1999, p. 224-7.
28. Diamandis EP, Yu H, Sutherland DJA. Detection of prostate-specific antigen immunoreactivity in breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1994;32:301-10.
29. Yu H, Diamandis EP. Prostate-specific antigen in milk of lactating women. *Clin Chem* 1995;41:54-8.
30. 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;68:424-7.
31. Myrtle JF, Klimley PG, Ivor LP, Bruni JF. Clinical utility of prostate specific antigen in the management of prostate cancer. *Advances in Cancer Diagnostics*. San Diego, Hybritech, Inc, 1986.
32. Catalona WJ, Richie JP, deKernion JB, Ahmann FR, Ratliff TL, Dalkin BL, Kavoussi LR, MacFarlane MT, Southwick PC. Comparison of prostate specific antigen concentration versus prostate specific antigen density in the early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves. *J Urol* 1994;152:2031-6.
33. Foj L, Filella X, Alcover J, Augé JM, Escudero JM, Molina R. Variability of assay methods for total and free PSA after WHO standardization. *Tumour Biol* 2014;35:1867-73.
34. Jarrigue V. The need for a lower total PSA cut-off value with PSA assays calibrated to the new WHO standard. *Clinical Laboratory International* April 2007.
35. Jansen FH, Roobol M, Bangma CH, van Schaik RH. Clinical impact of new prostate-specific antigen WHO standardization on biopsy rates and cancer detection. *Clin Chem* 2008;54:1999-2006.
36. Catalona WJ, Smith DS, Ornstein DK. Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 µg/L and benign prostate examination. Enhancement of specificity with free PSA measurements. *JAMA* 1997;277:1452-5
37. Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, Mottet N, Schmid HP, van der Kwast T, Wiegel T, Zattoni F; European Association of Urology. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *Eur Urol* 2011;59:61-71.
38. Yuan JJ, Coplen DE, Petros JA, Figenschau RS, Ratliff TL, Smith DS, et al. Effects of rectal examination, prostatic massage, ultrasonography and needle biopsy on serum prostate specific antigen levels. *J Urol* 1992;147:810-4.
39. Klein LT, Lowe FC. The effect of prostatic manipulation on Prostate-Specific Antigen levels. *Urol Clinics North America* 1997;24:293-7.

BIBLIOGRAFIA

40. Guess HA, Heyse JF, Gormley GJ. The effect of finasteride on prostate-specific antigen in men with benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 1993;22:31-7.
41. Tarver T. Cancer Facts & Figures 2012. American Cancer Society (ACS). *Journal of Consumer Health on the Internet* 2012;16:366-368.
42. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* 2009;360:1320-8.
43. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, Buys SS, Chia D, Church TR, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* 2009;360:1310-9.
44. Schröder FH, Roobol MJ. ERSPC and PLCO prostate cancer screening studies: what are the differences? *Eur Urol* 2010;58:46-52.
45. Chou R, Croswell JM, Dana T, Bougatsos C, Blazina I, Fu R, Gleitsmann K, Koenig HC, Lam C, Maltz A, Bruin Ruggie J, Lin K. Screening for Prostate Cancer: A Review of the Evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2011;155:762-771.
46. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, et al; ERSPC Investigators. Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. *N Engl J Med* 2012;366:981-90.
47. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR, et al.; PLCO Project Team. Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: mortality results after 13 years of follow-up. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:125-32.
48. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Zappa M, Nelen V, et al; ERSPC Investigators. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet* 2014;384:2027-35.
49. Filella X, Alcover J, Molina R, Carrere W, Carretero P, Ballesta AM. Usefulness of Prostate-specific antigen density as a diagnostic test of prostate cancer. *Tumor Biology* 1996;17:20-26.
50. Trapé J, Filella X, Alsina-Donadeu M, Juan-Pereira L, Bosch-Ferrer À, Rigo-Bonnin R. Increased plasma concentrations of tumour markers in the absence of neoplasia. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1605-20.

BIBLIOGRAFIA

51. Carter HB, Pearson JD, Metter EJ et al. Longitudinal evaluation of prostate specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA* 1992;267:2215-20.
52. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute GG et al. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age specific reference ranges. *JAMA* 1993;270:860-4.
53. Reed A, Ankerst DP, Pollock BH, Thompson IM, Parekh DI. Current age and race adjusted prostate specific antigen threshold values delay diagnosis of high grade prostate cancer. *J Urol* 2007;178:1929-32.
54. Benson MC, Whang IS, Pantuck A, et al. Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J Urol* 1992;147:815-6.
55. Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL, Wang TJ, Rittenhouse HG, Ratliff TL, Nadler RB. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. *JAMA* 1995;274:1214-20.
56. Lilja H, Christensson A, Dahlén U et al. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha-1-antichymotrypsin. *Clin Chem* 1991;37:1618-25.
57. Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H et al. A complex between Prostate-specific antigen and alfa-1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res* 1991;51:222-6.
58. Filella X, Alcover J, Molina R, Gimenez N, Rodriguez A, Jo J, et al Clinical Usefulness of free PSA fraction as an indicator of prostate cancer. *Int J Cancer* 1995;63:780-4.
59. Lee R, Localio AR, Armstrong K, Malkowicz SB, Schwartz JS. A meta-analysis of the performance characteristics of the free prostate-specific antigen test. *Urology* 2006; 67: 762-768.
60. Partin AW, Brawer MK, Bartsch G, Horninger W, Taneja SS, Lepor H, et al. Complexed prostate specific antigen improves specificity for prostate cancer detection: results of a prospective multicenter clinical trial. *J Urol* 2003;170:1787-91.
61. Gudmundsson J, Besenbacher S, Sulem P, Gudbjartsson DF, Olafsson I, Arinbjarnarson S, Agnarsson BA, Benediktsdottir KR, Isaksson HJ, Kostic JP, et al. Genetic correction of PSA values using sequence variants associated with PSA levels. *Sci Transl Med* 2010; 2:62ra92.
62. Helfand B, Roehl KA, Cooper PR, McGuire BB, Fitzgerald LM, Cancel-Tassin G, Cornu JN, Bauer S, van Blarigan EL, Chen X, et al. Associations of prostate cancer risk variants

BIBLIOGRAFIA

with disease aggressiveness: Results of the NCI-SPORE Genetics Working Group analysis of 18,343 cases. *Hum Genet* 2015; 134: 439-450.

63. Helfand BT, Loeb S, Hu Q, Cooper PR, Roehl KA, McGuire BB, Baumann NA, Catalona WJ. Personalized prostate specific antigen testing using genetic variants may reduce unnecessary prostate biopsies. *J Urol* 2013; 189: 1697-1701.

64. Kattan MW, Eastham JA, Stapleton AMF, Wheeler TM, Scardino PT. A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:766-71.

65. Stephenson AJ, Scardino PT, Eastham JA, Bianco FJ Jr, Dotan ZA, Fearn PA, et al. Preoperative nomogram predicting the 10-year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:715-7.

66. Carlson GD, Calvanese CB, Partin AW. An algorithm combining age, total prostate-specific antigen (PSA), and percent free PSA to predict prostate cancer: results on 4298 cases. *Urology* 1998;52:455-61.

67. Kranse R, Roobol M, Schröder FH. A graphical device to represent the outcomes of a logistic regression analysis. *Prostate* 2008;68:1674-80.

68. Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, et al. Assessing prostate cancer risk: Results from the prostate cancer prevention trial. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:529-34.

69. Karakiewicz PI, Benayoun S, Kattan MW, Perrotte P, Valiquette L, Scardino PT, et al. Development and validation of a nomogram predicting the outcome of prostate biopsy based on patient age, digital rectal examination and serum prostate specific antigen. *J Urol* 2005;173:1930-4.

70. Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 1999;59:5975-9.

71. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, Kiemeny LA, Witjes JA, Schalken JA. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 2003;44:8-15.

72. Schalken JA, Hessels D, Verhaegh G. New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3(PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology* 2003;62:34-43.

73. Clarke RA, Zhao Z, Guo AY, Roper K, Teng L, Fang ZM, et al. New genomic structure for prostate cancer specific gene PCA3 within BMCC1: implications for prostate cancer detection and progression. *PLoS One* 2009;4:e4995

BIBLIOGRAFIA

74. Ferreira LB, Palumbo A, de Mello KD, Sternberg C, Caetano MS, de Oliveira FL, et al. PCA3 noncoding RNA is involved in the control of prostate-cancer cell survival and modulates androgen receptor signaling. *BMC Cancer* 2012;12:507.
75. Fradet Y, Saad F, Aprikian A, Dessureault J, Elhilali M, Trudel C, et al. uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology* 2004;64:311-5.
76. Tinzi M, Marberger M, Horvath S, Chypre C. DD3PCA3 RNA analysis in urine – new perspective for detecting prostate cancer. *Eur Urol* 2004;46:182-6.
77. Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, Blase A, Bodrug S, Clark C, et al. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem* 2006;52:1089
78. Prostate Cancer Early Detection. National Cancer Comprehensive Network Clinical Practice Guidelines in Oncology. Version 2. 2016. Available online: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate_detection.pdf (accessed on 9 September 2016).
79. Ruiz-Aragón J, Márquez-Peláez S. Assessment of the PCA3 test for prostate cancer diagnosis: a systematic review and metaanalysis. *Actas Urol Esp* 2010;34:346-55.
80. Bradley LA, Palomaki GE, Gutman S, Samson D, Aronson N. Comparative effectiveness review: prostate cancer antigen 3 testing for the diagnosis and management of prostate cancer. *J Urol* 2013;190:389-98.
81. Luo Y, Gou X, Huang P, Mou C. Prostate cancer antigen 3 test for prostate biopsy decision: a systematic review and meta analysis. *Chin Med J* 2014;127:1768-74.
82. Luo Y, Gou X, Huang P, Mou C. The PCA3 test for guiding repeat biopsy of prostate cancer and its cut-off score: a systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl* 2014;16:487-92.
83. Haese A, de la Taille A, van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PF, et al. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur Urol* 2008;54:1081-8.
84. Crawford ED, Rove KO, Trabulsi EJ, Qian J, Drewnowska KP, Kaminetsky JC, et al. Diagnostic performance of PCA3 to detect prostate cancer in men with increased prostate specific antigen: a prospective study of 1962 cases. *J Urol* 2012;188:1726-31.
85. Capoluongo E, Zambon CF, Basso D, Boccia S, Rocchetti S, Leoncini E, et al. PCA3 score of 20 could improve prostate cancer detection: results obtained on 734 Italian individuals. *Clin Chim Acta* 2014;429:46–50.
86. Van Poppel H, Haese A, Graefen M, de la Taille A, Irani J, de Reijke T, et al. The relationship between prostate cancer gene 3 (PCA3) and prostate cancer significance. *BJU Int* 2012;109: 360–6.

BIBLIOGRAFIA

87. Durand X, Xylinas E, Radulescu C, Haus-Cheymol R, Moutereau S, Ploussard G, et al. The value of urinary prostate cancer gene 3 (PCA3) scores in predicting pathological features at radical prostatectomy. *BJU Int* 2012;110:43-9.
88. Hessels D, van Gils MP, van Hooij O, Jannink SA, Witjes JA, Verhaegh GW, et al. Predictive value of PCA3 in urinary sediments in determining clinico-pathological characteristics of prostate cancer. *Prostate* 2010;70:10-6
89. Ploussard G, Durand X, Xylinas E, Moutereau S, Radulescu C, Forgue A, et al. Prostate cancer antigen 3 score accurately predicts tumour volume and might help in selecting prostate cancer patients for active surveillance. *Eur Urol* 2011;59:422-9.
90. Van Gils MP, Hessels D, Hulsbergen-van de Kaa CA, Witjes JA, Jansen CF, Mulders PF, et al. Detailed analysis of histopathological parameters in radical prostatectomy specimens and PCA3 urine test results. *Prostate* 2008;68:1215-22.
91. Chevli KK, Duff M, Walter P, Yu C, Capuder B, Elshafei A, et al. Urinary PCA3 as a predictor for prostate cancer in a cohort of 3073 men undergoing initial prostate biopsy. *J Urol* 2014;191:1743-8.
92. Wei W, Leng J, Shao H, Wang W. High PCA3 scores in urine correlate with poor-prognosis factors in prostate cancer patients. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:16606-12.
93. Rubio-Briones J, Borque A, Esteban LM, Casanova J, Fernandez-Serra A, Rubio L, et al. Optimizing the clinical utility of PCA3 to diagnose prostate cancer in initial prostate biopsy. *BMC Cancer* 2015;15:633.
94. De Luca S, Passera R, Cattaneo G, Manfredi M, Mele F, Fiori C, et al. High prostate cancer gene 3 (PCA3) scores are associated with elevated Prostate Imaging Reporting and Data System (PI-RADS) grade and biopsy Gleason score, at magnetic resonance imaging/ultrasonography fusion software-based targeted prostate biopsy after a previous negative standard biopsy. *BJU Int* 2016;118:723-730.
95. Cui Y, Cao W, Li Q, Shen H, Liu C, Deng J, et al. Evaluation of prostate cancer antigen 3 for detecting prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2016;6:25776.
96. Fenstermaker M, Mendhiratta N, Bjurlin MA, Meng X, Rosenkrantz AB, Huang R, et al. Risk Stratification by Urinary Prostate Cancer Gene 3 Testing Before Magnetic Resonance Imaging-Ultrasound Fusion-targeted Prostate Biopsy Among Men With No History of Biopsy. *Urology* 2017;99:174-179.
97. Hu B, Yang H, Yang H. Diagnostic value of urine prostate cancer antigen 3 test using a cutoff value of 35 µg/L in patients with prostate cancer. *Tumour Biol* 2014; 35: 8573-8580.
98. Roobol MJ, Schröder FH, van Leenders GL, Hessels D, van den Bergh RC, Wolters T, et al. Performance of prostate cancer antigen 3 (PCA3) and prostate-specific antigen in

prescreened men: reproducibility and detection characteristics for prostate cancer patients with high PCA3 scores (≥ 100). *Eur Urol* 2010;58:893–9.

99. Schröder FH, Venderbos LD, van den Bergh RC, Hessels D, van Leenders GJ, van Leeuwen PJ, et al. Prostate cancer antigen 3: diagnostic outcomes in men presenting with urinary prostate cancer antigen 3 scores ≥ 100 . *Urology* 2014;83:613–6.

100. Merola R, Tomao L, Antenucci A, Sperduti I, Sentinelli S, Masi S, et al. PCA3 in prostate cancer and tumor aggressiveness detection on 407 high-risk patients: A National Cancer Institute experience. *J. Exp. Clin. Cancer Res* 2015; 34: 15-25.

101. De la Taille A, Martínez-Piñeiro L, Cabri P, Houchard A, Schalken J; Triptocare LT study group. Factors predicting progression to castrate-resistant prostate cancer in patients with advanced prostate cancer receiving long-term androgen deprivation therapy. *BJU Int* 2017;119:74-81.

102. Vlaeminck-Guillem V, Devonec M, Champetier D, Decaussi-Petrucci M, Paparel P, Perrin P, et al. Urinary PCA3 to predict prostate cancer in a cohort of 1015 patients. *Prog Urol* 2015;25:1160-8.

103. Wei JT, Feng Z, Partin AW, Brown E, Thompson I, Sokoll L, et al. Can urinary PCA3 Supplement PSA in the early detection of prostate cancer? *J Clin Oncol* 2014;32:4066-72.

104. Auprich M, Bjartell A, Chun FK, de la Taille A, Freedland SJ, Haese A, et al. Contemporary role of prostate cancer antigen 3 in the management of prostate cancer. *Eur Urol* 2011;60:1045–54.

105. Mikolajczyk SD, Marks LS, Partin AW, Rittenhouse HG. Free prostate-specific antigen in serum is becoming more complex. *Urology* 2002;59:797-802.

106. Mikolajczyk SD, Marker KM, Millar LS, Kumar A, Saedi MS, Payne JK, et al. A truncated precursor form of prostate-specific antigen is a more specific serum marker of prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61:6958–63.

107. Filella X, Giménez N. Evaluation of [-2] proPSA and Prostate Health Index (PHI) for the detection of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:729-39.

108. Wang W, Wang M, Wang L, Adams TS, Tian Y, Xu J. Diagnostic ability of %p2PSA and prostate health index for aggressive prostate cancer: a meta-analysis. *Sci Rep* 2014;4:5012.

109. Stephan C, Vincendeau S, Houlgatte A, Cammann H, Jung K, Semjonow A. Multicenter evaluation of [-2]proprostate-specific antigen and the prostate health index for detecting prostate cancer. *Clin Chem* 2013;59:306–14.

BIBLIOGRAFIA

110. Lazzeri M, Haese A, de la Taille A, Palou Redorta J, McNicholas T, Lughezzani G, et al. Serum isoform [-2]proPSA derivatives significantly improve prediction of prostate cancer at initial biopsy in a total PSA range of 2-10 ng/ml: a multicentric European study. *Eur Urol* 2013;63:986-94.
111. Sokoll LJ, Sanda MG, Feng Z, Kagan J, Mizrahi IA, Broyles DL, et al. A prospective, multicenter, National Cancer Institute Early Detection Research Network study of [-2]proPSA: improving prostate cancer detection and correlating with cancer aggressiveness. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1193-200.
112. Stephan C, Kahrs AM, Cammann H, Lein M, Schrader M, Deger S, et al. A [-2]proPSA-based artificial neural network significantly improves differentiation between prostate cancer and benign prostatic diseases. *Prostate* 2009;69:198-207.
113. Guazzoni G, Nava L, Lazzeri M, Scattoni V, Lughezzani G, Maccagnano C, et al. Prostate-specific antigen (PSA) isoform p2PSA significantly improves the prediction of prostate cancer at initial extended prostate biopsies in patients with total PSA between 2.0 and 10 ng/ml: results of a prospective study in a clinical setting. *Eur Urol* 2011;60:214-22.
114. Fossati N, Buffi NM, Haese A, Stephan C, Larcher A, McNicholas T, et al. Preoperative Prostate-specific Antigen isoform p2PSA and its derivatives; %p2PSA and Prostate Health Index; predict pathologic outcomes in patients undergoing radical prostatectomy for prostate cancer: Results from a multicentric European prospective study. *Eur Urol* 2015; 68:132-138.
115. Lughezzani G, Lazzeri M, Haese A, McNicholas T, de la Taille A, Buffi NM, et al. Multicenter european external validation of a prostate health index-based nomogram for predicting prostate cancer at extended biopsy. *Eur Urol* 2014;66:906-12.
116. Abrate A, Lazzeri M, Lughezzani G, et al. Clinical performance of the Prostate Health Index (PHI) for the prediction of prostate cancer in obese men: data from the PROMetheus project, a multicentre European prospective study. *BJU Int* 2015; 115:537-45.
117. Nordström T, Vickers A, Assel M, Lilja H, Grönberg H, Eklund M. Comparison Between the Four-kallikrein Panel and Prostate Health Index for Predicting Prostate Cancer. *Eur Urol* 2015;68:139-46.
118. Lazzeri M, Lughezzani G, Haese A, et al. Clinical performance of prostate Health index in men with tPSA>10ng/ml: Results from a multicentric European study. *Urol Oncol* 2016; 34:415e.13-9.
119. Tosoian JJ, Druskin SC, Andreas D, Mullane P, Chappidi M, Joo S, et al. Use of the Prostate Health Index for detection of prostate cancer: results from a large academic practice. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2017 Jan 24. doi: 10.1038/pcan.2016.72.
120. Nichol MB, Wu J, Huang J, Denham D, Frencher SK, Jacobsen SJ. Cost-effectiveness of Prostate Health Index for prostate cancer detection. *BJU Int* 2011;110:353-62.

BIBLIOGRAFIA

121. Bruzzese D, Mazzeola C, Ferro M, Perdonà S, Chiodini P, Perruolo G, et al. Prostate health index vs. percent free prostate-specific antigen for prostate cancer detection in men with “gray” prostate-specific antigen levels at first biopsy: Systematic review and meta-analysis. *Transl Res* 2014; 164: 444-451.
122. Jansen FH, van Schaik RH, Kurstjens J, Horninger W, Klocker H, Bektic J, et al. Prostate-specific antigen (PSA) isoform p2PSA in combination with total PSA and free PSA improves diagnostic accuracy in prostate cancer detection. *Eur Urol* 2010;57:921-7.
123. Loeb S, Sanda MG, Broyles DL, Shin SS, Bangma CH, Wei JT, et al. The prostate health index selectively identifies clinically significant prostate cancer. *J Urol* 2015; 193: 1163-1169.
124. Tosoian JJ, Loeb S, Feng Z, Isharwal S, Landis P, Elliot DJ, et al. Association of [-2]proPSA with biopsy reclassification during active surveillance for prostate cancer. *J Urol* 2012;188:1131–6.
125. De la Calle C, Patil D, Wei JT, Scherr DS, Sokoll L, Chan DW, et al. Multicenter Evaluation of the Prostate Health Index to Detect Aggressive Prostate Cancer in Biopsy Naïve Men. *J Urol* 2015;194:65-72.
126. Mikolajczyk SD, Song Y, Wong JR, Matson RS, Rittenhouse HG. Are multiple markers the future of prostate cancer diagnostics? *Clin Biochem* 2004;37:519-28.
127. Lughezzani G, Lazzeri M, Larcher A, Lista G, Scattoni V, Cestari A, et al. Development and internal validation of a Prostate Health Index based nomogram for predicting prostate cancer at extended biopsy. *J Urol* 2012;188:1144-50
128. Roobol MJ, Moniek M, Vedder MM, Nieboer D, Houlgatte A, Vincendeau S, et al. Comparison of two prostate cancer risk calculators that include the Prostate Health Index. *Eur Urol Focus* 2015; 1: 185-190.
129. Heijnsdijk EA, Denham D, de Koning HJ. The cost-effectiveness of prostate cancer detection with the use of Prostate Health Index. *Value Health* 2016; 19: 153-157.
130. Vickers AJ, Cronin AM, Aus G, Pihl CG, Becker C, Pettersson K, et al. A panel of kallikrein markers can reduce unnecessary biopsy for prostate cancer: Data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Göteborg, Sweden. *BMC Med* 2008; 6: 19.
131. Vickers A, Cronin A, Roobol M, Savage C, Peltola M, Pettersson K, et al. Reducing unnecessary biopsy during prostate cancer screening using a four-kallikrein panel: An independent replication. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2493-2498.
132. Vickers AJ, Cronin AM, Roobol MJ, Savage CJ, Peltola M, Pettersson K, et al. A four-kallikrein panel predicts prostate cancer in men with recent screening: Data from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer, Rotterdam. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3232-3239.

BIBLIOGRAFIA

133. Vickers AJ, Cronin AM, Aus G, Pihl CG, Becker C, Pettersson K, et al. Impact of recent screening on predicting the outcome of prostate cancer biopsy in men with elevated prostate-specific antigen: Data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Gothenburg, Sweden. *Cancer* 2010; 116: 2612-2620.
134. Gupta A, Roobol MJ, Savage CJ, Peltola M, Pettersson K, Scardino PT, et al. A four-kallikrein panel for the prediction of repeat prostate biopsy: data from the European Randomized Study of Prostate Cancer screening in Rotterdam, Netherlands. *Br J Cancer* 2010; 103: 708-714.
135. Benchikh A, Savage C, Cronin A, Salama G, Villers A, Lilja H, Vickers A. A panel of kallikrein markers can predict outcome of prostate biopsy following clinical work-up: an independent validation study from the European Randomized Study of Prostate Cancer screening, France. *BMC Cancer* 2010; 10: 635.
136. Vickers AJ, Gupta A, Savage CJ, Pettersson K, Dahlin A, Bjartell A, et al. A panel of kallikrein marker predicts prostate cancer in a large; population-based cohort followed for 15 years without screening. *Cancer Epidemiol. Biomark Prev* 2011; 20: 255-261.
137. Carlsson SV, Peltola MT, Sjöberg D, Schröder FH, Hugosson J, Pettersson K, et al. Can one blood draw replace transrectal ultrasonography-estimated prostate volume to predict prostate cancer risk? *BJU Int* 2013; 112: 602–609.
138. Parekh DJ, Punnen S, Sjöberg DD, Asroff SW, Bailen JL, Cochran JS, et al. A Multi-institutional prospective trial in the USA confirms that the 4K score accurately identifies men with high-grade prostate cancer. *Eur Urol* 2015; 68: 464-470.
139. Stattin P, Vickers AJ, Sjöberg DD, Johansson R, Granfors T, Johansson M, et al. Improving the specificity of screening for lethal prostate cancer using Prostate-specific Antigen and a panel of kallikrein markers: A nested case-control study. *Eur Urol* 2015; 68: 207-13.
140. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005; 310: 644-648.
141. Carrère S, Verger A, Flourens A, Stehelin D, Duterque-Coquillaud M. Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains. *Oncogene* 1998; 16: 3261-3268.
142. Verger A, Duterque-Coquillaud M. When Ets transcription factors meet their partners. *Bioessays* 2002; 24: 362-370.

BIBLIOGRAFIA

143. Boström PJ, Bjartell AS, Catto JW, Eggener SE, Lilja H, Loeb S, et al. Genomic predictors of outcome in prostate cancer. *Eur Urol* 2015; 68: 1033-1044.
144. Wang J, Cai Y, Yu W, Ren C, Spencer DM, Ittmann M. Pleiotropic Biological Activities of Alternatively Spliced TMPRSS2/ERG Fusion Gene Transcripts. *Cancer Res* 2008; 68: 8516-8524.
145. Leyten GH, Hessels D, Jannink SA, Smit FP, de Jong H, Cornel EB, et al. Prospective multicentre evaluation of PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic and prognostic urinary biomarkers for prostate cancer. *Eur Urol* 2014; 65: 534-542.
146. Tomlins SA, Day JR, Lonigro RJ, Hovelson DH, Siddiqui J, Kunju LP, et al. Urine TMPRSS2:ERG Plus PCA3 for individualized prostate cancer risk assessment. *Eur Urol* 2016; 70: 45-53.
147. Stephan C, Cammann H, Jung K. Urine TMPRSS2:ERG Plus PCA3 for individualized prostate cancer risk assessment. *Eur Urol* 2015; 68: e106–e107.
148. Esgueva R, Perner S, J LaFargue C, Scheble V, Stephan C, Lein M, et al. Prevalence of TMPRSS2-ERG and SLC45A3-ERG gene fusions in a large prostatectomy cohort. *Mod Pathol* 2010; 23: 539-546.
149. Mwamukonda K, Chen Y, Ravindranath L, Furusato B, Hu Y, Sterbis J, et al. Quantitative expression of TMPRSS2 transcript in prostate tumor cells reflects TMPRSS2-ERG fusion status. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2009; 13: 47-51.
150. Mosquera JM, Mehra R, Regan MM, Perner S, Genega EM, Bueti G, et al. Prevalence of TMPRSS2-ERG Fusion Prostate Cancer among Men Undergoing Prostate Biopsy in the United States. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4706-4711.
151. Darnel AD, Lafargue CJ, Vollmer RT, Corcos J, Bismar TA. TMPRSS2-ERG fusion is frequently observed in Gleason pattern 3 prostate cancer in a Canadian cohort. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 125-130.
152. Rouzier C, Haudebourg J, Carpentier X, Valério L, Amiel J, Michiels JF, et al. Detection of the TMPRSS2-ETS fusion gene in prostate carcinomas: retrospective analysis of 55 formalin-fixed and paraffin-embedded samples with clinical data. *Cancer Genet Cytogenet* 2008; 183: 21-27.
153. Furusato B, Gao CL, Ravindranath L, Chen Y, Cullen J, McLeod DG, et al. Mapping of TMPRSS2-ERG fusions in the context of multi-focal prostate cancer. *Mod Pathol* 2008;21: 67-75.
154. Tu JJ, Rohan S, Kao J, Kitabayashi N, Mathew S, Chen YT. Gene fusions between

BIBLIOGRAFIA

TMPRSS2 and ETS family genes in prostate cancer: frequency and transcript variant analysis by RT-PCR and FISH on paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol* 2007; 20: 921-928.

155. Albadine R, Latour M, Toubaji A, Haffner M, Isaacs WB, Platz E, et al. TMPRSS2-ERG gene fusion status in minute (minimal) prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2009; 22: 1415-1422.

156. Fitzgerald LM, Agalliu I, Johnson K, Miller MA, Kwon EM, Hurtado-Coll A, et al. Association of TMPRSS2-ERG gene fusion with clinical characteristics and outcomes: results from a population-based study of prostate cancer. *BMC Cancer* 2008; 8: 230.

157. Saramäki OR, Harjula AE, Martikainen PM, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. TMPRSS2: ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3395-3400.

158. Winnes M, Lissbrant E, Damber JE, Stenman G. Molecular genetic analyses of the TMPRSS2-ERG and TMPRSS2-ETV1 gene fusions in 50 cases of prostate cancer. *Oncol Rep* 2007; 17: 1033-1036.

159. Hermans KG, Boormans JL, Gasi D, van Leenders GJ, Jenster G, Verhagen PC, et al. Overexpression of Prostate-Specific TMPRSS2(exon 0)-ERG Fusion Transcripts Corresponds with Favorable Prognosis of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6398-6403.

160. Barwick BG, Abramovitz M, Kodani M, Moreno CS, Nam R, Tang W, et al. Prostate cancer genes associated with TMPRSS2-ERG gene fusion and prognostic of biochemical recurrence in multiple cohorts. *Br J Cancer* 2010; 102: 570-576.

161. Nam RK, Sugar L, Yang W, Srivastava S, Klotz LH, Yang LY, et al. Expression of the TMPRSS2:ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer. *Br J Cancer* 2007; 97: 1690-1695.

162. Bonaccorsi L, Nesi G, Nuti F, Paglierani M, Krausz C, Masieri L, et al. Persistence of expression of the TMPRSS2:ERG fusion gene after pre-surgery androgen ablation may be associated with early prostate specific antigen relapse of prostate cancer: preliminary results. *J Endocrinol Invest* 2009, 32: 590-596.

163. Rostad K, Hellwinkel OJ, Haukaas SA, Halvorsen OJ, Øyan AM, Haese A, et al. TMPRSS2:ERG fusion transcripts in urine from prostate cancer patients correlate with a less favorable prognosis. *APMIS* 2009; 117: 575-582.

164. Mehra R, Tomlins SA, Shen R, Nadeem O, Wang L, Wei JT, et al. Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer. *Mod Pathol* 2007; 20: 538-544.

BIBLIOGRAFIA

165. Perner S, Svensson MA, Hossain RR, Day JR, Groskopf J, Slaughter RC, et al. ERG Rearrangement Metastasis Patterns in Locally Advanced Prostate Cancer. *Urology* 2010; 75: 762-767.
166. Demichelis F, Fall K, Perner S, Andrén O, Schmidt F, Setlur SR, et al. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* 2007; 26: 4596-4599.
167. Hu Y, Dobi A, Sreenath T, Cook C, Tadase AY, Ravindranath L, et al. Delineation of TMPRSS2-ERG Splice Variants in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4719- 4725.
168. Wang J, Cai Y, Ren C, Ittmann M. Expression of Variant TMPRSS2/ERG Fusion Messenger RNAs Is Associated with Aggressive Prostate Cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 8347-8351.
169. Carver BS, Tran J, Gopalan A, Chen Z, Shaikh S, Carracedo A, et al. Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat Genet* 2009; 41: 619-624.
170. Boormans JL, Porkka K, Visakorpi T, Trapman J. Confirmation of the association of TMPRSS2 (exon 0):ERG expression and a favorable prognosis of primary prostate cancer. *Eur Urol* 2011; 60: 183-184.
171. Gopalan A, Leversha MA, Satagopan JM, Zhou Q, Al-Ahmadie HA, Fine SW, et al. TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. *Cancer Res* 2009;69: 1400-1406.
172. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011;12:861–74.
173. Sun T, Ye H, Wu CL, Lee GS, Kantoff PW. Emerging players in prostate cancer: long non-coding RNAs. *Am J Clin Exp Urol* 2014;2:294.
174. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843–54.
175. Griffiths-Jones S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2006;342:129-38.
176. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, How Huang K, Jen Lee M, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010;56:1733-41.
177. Lan H, Lu H, Wang X, Jin H. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. *BioMed Res Int* 2015;2015:1–17.

BIBLIOGRAFIA

178. Whale AS, Huggett JF, Cowen S, Speirs V, Shaw J, Ellison S, et al. Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. *Nucleic Acids Res* 2012;40:e82.
179. Ma J, Li N, Guarnera M, Jiang F. Quantification of plasma miRNAs by digital PCR for cancer diagnosis. *Biomark Insights* 2013;8:127-36.
180. Pang Y, Young CY, Yuan H. MicroRNAs and prostate cancer. *Acta Biochim Biophys Sin* 2010;42:363-9.
181. Goto Y, Kurozumi A, Enokida H, Ichikawa T, Seki N. Functional significance of aberrantly expressed microRNAs in prostate cancer. *Int J Urol* 2015;22:242-52.
182. Fang YX, Gao WQ. Roles of microRNAs during prostatic tumorigenesis and tumor progression. *Oncogene* 2014;33:135-47.
183. Lewis H, Lance R, Troyer D, Beydoun H, Hadley M, Orians J, et al. miR-888 is an expressed prostatic secretions-derived microRNA that promotes prostate cell growth and migration. *Cell Cycle Georget Tex* 2014;13:227-39.
184. Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med* 2011;17:211-5.
185. Kong D, Heath E, Chen W, Cher ML, Powell I, Heilbrun L, et al. Loss of let-7 up-regulates EZH2 in prostate cancer consistent with the acquisition of cancer stem cell signatures that are attenuated by BR-DIM. *PLoS One* 2012;7:e33729.
186. Folini M, Gandellini P, Longoni N, Profumo V, Callari M, Pennati M, et al. miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer. *Mol Cancer* 2010;9:12.
187. Li T, Li D, Sha JJ, Sun P, Huang YR. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;383:280-5.
188. Kojima K, Fujita Y, Nozawa Y, Deguchi T, Ito M. MiR-34a attenuates paclitaxel resistance of hormone-refractory prostate cancer PC3 cells through direct and indirect mechanisms. *Prostate* 2010;70:1501-12.
189. Verdoodt B, Neid M, Vogt M, Kuhn V, Liffers ST, Palisaar RJ, et al. MicroRNA-205, a novel regulator of the anti-apoptotic protein Bcl2, is downregulated in prostate cancer. *Int J Oncol* 2013;43:307-14.

BIBLIOGRAFIA

190. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119:1420-8.
191. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008;10:593-601.
192. Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, et al. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucl Acids Res* 2005;33:6566-78.
193. Ren D, Wang M, Guo W, Huang S, Wang Z, Zhao X, et al. Double-negative feedback loop between ZEB2 and miR-145 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in prostate cancer cells. *Cell Tissue Res* 2014;358:763-78.
194. Coppola V, Musumeci M, Patrizii M, Cannistraci A, Addario A, Maugeri-Saccà M, et al. BTG2 loss and miR-21 upregulation contribute to prostate cell transformation by inducing luminal markers expression and epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 2013;32:1843-53.
195. Lawson DA, Zong Y, Memarzadeh S, Xin L, Huang J, Witte ON. Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:2610-5.
196. Reis ST, Pontes-Junior J, Antunesnes AA, Dall Oglio MF, Dip N, Passerotti CC, et al. miR-21 may acts as an oncomir by targeting RECK, a matrix metalloproteinase regulator, in prostate cancer. *BMC Urol* 2012;12:14.
197. Wang L, Song G, Tan W, Qi M, Zhang L, Chan J, et al. miR-573 inhibits prostate cancer metastasis by regulating epithelialmesenchymal transition. *Oncotarget* 2015;6:35978-90.
198. ChunJiao S, Huan C, ChaoYang X, GuoMei R. Uncovering the roles of miRNAs and their relationship with androgen receptor in prostate cancer. *IUBMB Life* 2014;66:379-86.
199. Ayub SG, Kaul D, Ayub T. Microdissecting the role of micro-RNAs in the pathogenesis of prostate cancer. *Cancer Genet* 2015;208:289-302.
200. Goto Y, Kojima S, Nishikawa R, Kurozumi A, Kato M, Enokida H, et al. MicroRNA expression signature of castration-resistant prostate cancer: the microRNA-221/222 cluster functions as a tumour suppressor and disease progression marker. *Br J Cancer* 2015;113:1055-65.
201. Sun T, Wang X, He HH, Sweeney CJ, Liu SX, Brown M, et al. MiR-221 promotes the development of androgen independence in prostate cancer cells via downregulation of

BIBLIOGRAFIA

HECTD2 and RAB1A. *Oncogene* 2014;33:2790-800.

202. Yang X, Yang Y, Gan R, Zhao L, Li W, Zhou H, et al. Downregulation of mir-221 and mir-222 restrain prostate cancer cell proliferation and migration that is partly mediated by activation of SIRT1. *PLoS One* 2014;9:e98833.

203. Ottman R, Nguyen C, Lorch R, Chakrabarti R. MicroRNA expressions associated with progression of prostate cancer cells to antiandrogen therapy resistance. *Mol Cancer* 2014;13:1.

204. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:10513-8.

205. Witwer KW. Circulating microRNA biomarker studies: Pitfalls and potential solutions. *Clin Chem* 2015; 61: 56-63.

206. Mihelich BL, Maranville JC, Nolley R, Peehl DM, Nonn L. Elevated serum microRNA levels associate with absence of high-grade prostate cancer in a retrospective cohort. *PLoS One* 2015;10:e0124245.

207. Shen J, Hruba GW, McKiernan JM, Gurvich I, Lipsky MJ, Benson MC, et al. Dysregulation of circulating microRNAs and prediction of aggressive prostate cancer. *Prostate* 2012;72:1469-77.

208. Chen ZH, Zhang GL, Li HR, Luo JD, Li ZX, Chen GM, et al. A panel of five circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer. *Prostate* 2012;72:1443-52

209. Moltzahn F, Olshen AB, Baehner L, Peek A, Fong L, Stöppler H, et al. Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients. *Cancer Res* 2011;71: 550-60.

210. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, How Huang K, Jen Lee M, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010;56:1733-41.

211. Mlcochova H, Hezova R, Meli AC, Slaby O. Urinary MicroRNAs as a new class of noninvasive biomarkers in oncology, nephrology, and cardiology. *Methods Mol Biol* 2015;1218:439-63.

212. Srivastava A, Goldberger H, Dimtchev A, Ramalinga M, Chijioke J, Marian C, et al. MicroRNA profiling in prostate cancer – the diagnostic potential of urinary miR-205 and miR-214. *PLoS One* 2013;8:e76994.

213. Sapre N, Hong MK, Macintyre G, Lewis H, Kowalczyk A, Costello AJ, et al. Curated

BIBLIOGRAFIA

microRNAs in urine and blood fail to validate as predictive biomarkers for high-risk prostate cancer. *PLoS One* 2014;9:e91729.

214. Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JW, Marsden G, Vessella RL, Rhee B, et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer* 2012;106:768-74.

215. Ahumada-Tamayo S, Saavedra-Briones D, Cantellano-Orozco M, Salido-Guadarrama A, Rodríguez-Dorantes M, Urdiales-Ortiz A, et al. MicroRNA determination in urine for prostate cancer detection in Mexican patients at the Hospital General “Dr.Manuel Gea González”. *Rev Mex Urol* 2011;71:213-7.

216. Korzeniewski N, Tosev G, Pahernik S, Hadaschik B, Hohenfellner M, Duensing S. Identification of cell-free microRNAs in the urine of patients with prostate cancer. *Urol Oncol* 2015;33:16. e17-22.

217. Corcoran C, Rani S, O’Driscoll L. miR-34a is an intracellular and exosomal predictive biomarker for response to docetaxel with clinical relevance to prostate cancer progression. *Prostate* 2014;74:1320-34.

218. Haj-Ahmad TA, Abdalla MA, Haj-Ahmad Y. Potential urinary miRNA biomarker candidates for the accurate detection of prostate cancer among benign prostatic hyperplasia patients. *J Cancer* 2014;5:182-91.

219. Casanova-Salas I, Rubio-Briones J, Calatrava A, Mancarella C, Masiá E, Casanova J, et al. Identification of miR-187 and miR-182 as biomarkers of early diagnosis and prognosis in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol* 2014;192:252-9.

220. Stephan C, Jung M, Rabenhorst S, Kilic E, Jung K. Urinary miR-183 and miR-205 do not surpass PCA3 in urine as predictive markers for prostate biopsy outcome despite their highly dysregulated expression in prostate cancer tissue. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:1109-18.

221. Egidi MG, Guelfi G, Cochetti G, Poli G, Barillaro F, Zampini D, et al. Characterization of kallireins and microRNAs in urine sediment for the discrimination of prostate cancer from benign prostatic hyperplasia. *J Cancer Sci Ther* 2015;7:130-6.

222. Yun SJ, Jeong P, Kang HW, Kim Y-H, Kim E-A, Yan C, et al. Urinary microRNAs of prostate cancer: virus-encoded hsv1-miRH18 and hsv2-miR-H9-5p could be valuable diagnostic markers. *Int Neurourol J* 2015;19:74-84.

223. Salido-Guadarrama AI, Morales-Montor JG, Rangel-Escareño C, Langley E, Peralta-Zaragoza O, Cruz-Colin JL, Rodríguez-Dorantes M. Urinary microRNA-based signature improves accuracy of detection of clinically relevant prostate cancer within the prostate-specific antigen grey zone. *Mol Med Rep* 2016; 13: 4549-4560.

BIBLIOGRAFIA

224. Trams EG, Lauter CJ, Salem N Jr, Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1981; 645: 63-70.
225. Zhou H, Yuen PS, Pisitkun T, Gonzales PA, Yasuda H, Dear JW, et al. Collection; storage; preservation; and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int* 2006; 69: 1471-1476.
226. Ge Q, Zhou Y, Lu J, Bai Y, Xie X, Lu Z. miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions. *Molecules* 2014; 19: 1568-1575.
227. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Onco* 2008; 110: 13-21.
228. Duijvesz D, Versluis CY, van der Fels CA, Vredenburg-van den Berg MS, Leivo J, Peltola MT, et al. Immuno-based detection of extracellular vesicles in urine as diagnostic marker for prostate cancer. *Int J Cancer* 2015; 137: 2869-2878.
229. Rabinowits G, Gercel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: A diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2009; 10: 42-46.
230. Silva J, Garcia V, Rodriguez M, Compte M, Cisneros E, Veguillas P, et al. Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51: 409–418.
231. Yeh YY, Ozer HG, Lehman AM, Maddocks K, Yu L, Johnson AJ, et al. Characterization of CLL exosomes reveals a distinct microRNA signature and enhanced secretion by activation of BCR signaling. *Blood* 2015; 125: 3297-305.
232. Ratajczak MZ, Ratajczak J. Horizontal transfer of RNA and proteins between cells by extracellular microvesicles: 14 years later. *Cli Transl Me* 2016; 5: 7.
233. O'Driscoll L. Expanding on exosomes and ectosomes in cancer. *N Engl J Med* 2015; 372: 2359-2362.
234. Franzen CA, Blackwell RH, Todorovic V, Greco KA, Foreman KE, Flanigan RC, et al. Urothelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition after exposure to muscle invasive bladder cancer exosomes. *Oncogenesis* 2015; 4: e163.
235. Abd Elmageed ZY, Yang Y, Thomas R, Ranjan M, Mondal D, Moroz K, et al. Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes. *Stem Cells* 2014; 32: 983-997.
236. Hosseini-Beheshti E, Choi W, Weiswald LB, Kharmate G, Ghaffari M, Roshan-Moniri

BIBLIOGRAFIA

- M, et al. Exosomes confer pro-survival signals to alter the phenotype of prostate cells in their surrounding environment. *Oncotarget* 2016;7:14639-58
237. They C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006;Chapter 3:Unit 3.22.
238. Øverbye A, Skotland T, Koehler CJ, Thiede B, Seierstad T, Berge V, et al. Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes. *Oncotarget* 2015; 6: 30357-30376.
239. Dijkstra S, Birker IL, Smit FP, Leyten GH, de Reijke TM, van Oort IM, et al. Prostate cancer biomarker profiles in urinary sediments and exosomes. *J Urol* 2014; 191: 1132-1138.
240. Hendriks RJ, Dijkstra S, Jannink SA, Steffens MG, van Oort IM, Mulders PF, et al. Comparative analysis of prostate cancer specific biomarkers PCA3 and ERG in whole urine; urinary sediments and exosomes. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54: 483-492.
241. Donovan MJ, Noerholm M, Bentink S, Belzer S, Skog J, O'Neill V, et al. A molecular signature of PCA3 and ERG exosomal RNA from non-DRE urine is predictive of initial prostate biopsy result. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2015; 18: 370-375.
242. Cheng L, Sun X, Scicluna BJ, Coleman BM, Hill AF. Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine. *Kidney Int* 2014; 86: 433-444.
243. Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, Hill AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J. Extracell. Vesicles* 2014; 3, doi:10.3402/jev.v3.23743.
244. Mall C, Rocke DM, Durbin-Johnson B, Weiss RH. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. *Biomark Med* 2013; 7: 623-631.
245. Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A. Exosomal miRNAs as Biomarkers for Prostate Cancer. *Front Genet* 2013; 4: 36.
246. Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, et al. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 14888-14893.
247. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 5003-5008.
248. Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in

BIBLIOGRAFIA

- serum and saliva is concentrated in exosomes. PLoS ONE 2012; 7: e30679.
249. Li Z, Ma YY, Wang J, Zeng XF, Li R, Kang W, et al. Exosomal microRNA-141 is upregulated in the serum of prostate cancer patients. *Onco Targets Ther* 2015; 9: 139-148.
250. Huang X, Yuan T, Liang M, Du M, Xia S, Dittmar R, et al. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol* 2015; 67: 33–41.
251. Bryzgunova OE, Zaripov MM, Skvortsova TE, Lekchnov EA, Grigor'eva AE, Zaporozhchenko IA, et al. Comparative Study of Extracellular Vesicles from the Urine of Healthy Individuals and Prostate Cancer Patients. *PLoS ONE* 2016; 11: e0157566.
252. Samsonov R, Shtam T, Burdakov V, Glotov A, Tsyrlina E, Berstein L, et al. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic. *Prostate* 2016; 76:68-79.
253. Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Menezes R, Misovic B, Wachalska M, Geldof A, et al. Non-invasive prostate cancer detection by measuring miRNA variants (isomiRs) in urine extracellular vesicles. *Oncotarget* 2016;7:22566-78.
254. Chou R, Crosswell JM, Dana T, Bougatsos C, Blazina I, Fu R, et al. Screening for prostate cancer: a review of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2011;155:762-71.
255. Catalona WJ, Partin AW, Sanda MG, Wei JT, Klee GG, Bangma CH, et al. A multicenter study of [-2] pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *J Urol* 2011;185:1650-5.
256. Stephan C. Different indications for the use of PHI. XV International symposium on biology and clinical usefulness of tumor markers. Barcelona, febrer 2017.
257. Klotz L. Active surveillance for prostate cancer: overview and update. *Curr Treat Options Oncol* 2013;14:97-108.
258. Wilt TJ, Brawer MK, Jones KM, Barry MJ, Aronson WJ, Fox S, et al. Prostate Cancer Intervention versus Observation Trial (PIVOT) Study Group. Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer. *N Engl J Med* 2012;367:203-13.
259. Truong M, Yang B, Jarrard DF. Toward the detection of prostate cancer in urine: a critical analysis. *J Urol* 2013;189:422–9.
260. Sokoll LJ, Ellis W, Lange P, et al. A multicenter evaluation of the PCA3 molecular urine

BIBLIOGRAFIA

test: pre-analytical effects, analytical performance, and diagnostic accuracy. *Clin Chim Acta* 2008;389:1-6.

261. Filella X, Foj L, Milà M, Augé JM, Molina R, Jiménez W. PCA3 in the detection and management of early prostate cancer. *Tumour Biol* 2013;34:1337-47.

262. Dijkstra S, Mulders PF, Schalken JA. Clinical use of novel urine and blood based prostate cancer biomarkers: a review. *Clin Biochem* 2014;47:889-96.

263. De la Taille A, Irani J, Graefen M, et al. Clinical evaluation of the PCA3 assay in guiding initial biopsy decisions. *J Urol* 2011;185:2119–25.

264. Perdonà S, Bruzzese D, Ferro M, et al. Prostate health index (phi) and prostate cancer antigen 3 (PCA3) significantly improve diagnostic accuracy in patients undergoing prostate biopsy. *Prostate* 2013;73:227-35.

265. Ferro M, Bruzzese D, Perdonà S, et al. Predicting prostate biopsy outcome: prostate health index (phi) and prostate cancer antigen 3 (PCA3) are useful biomarkers. *Clin Chim Acta* 2012;413:1274-8.

266. Stephan C, Jung K, Semjonow A, et al. Comparative assessment of urinary prostate cancer antigen 3 and TMPRSS2:ERG gene fusion with the serum [-2] prostatespecific antigen-based prostate health index for detection of prostate cancer. *Clin Chem* 2013;59:280-8.

267. Auprich M, Augustin H, Budäus L, et al. A comparative performance analysis of total prostate-specific antigen, percentage free prostate-specific antigen, prostate-specific antigen velocity and urinary prostate cancer gene 3 in the first, second and third repeat prostate biopsy. *BJU Int* 2012;109:1627–35.

268. Salami SS, Schmidt F, Laxman B, Regan MM, Rickman DS, Scherr D, et al. Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. *Urol Oncol* 2013;31:566–71.

269. Chun FK, de la Taille A, van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PF, et al. Prostate cancer gene 3 (PCA3): development and internal validation of a novel biopsy nomogram. *Eur Urol* 2009;56:659–67.

270. Rigau M, Morote J, Mir MC, Ballesteros C, Ortega I, Sanchez A, et al. PSGR and PCA3 as biomarkers for the detection of prostate cancer in urine. *Prostate* 2010;70:1760–7.

271. Rubio-Briones J, Fernández-Serra A, Ramírez M, Rubio L, Collado A, Casanova J, et al. Outcomes of expanded use of PCA3 testing in a Spanish population with clinical suspicion of prostate cancer. *Actas Urol Esp* 2011;35:589–96.

BIBLIOGRAFIA

272. Fabris L, Ceder Y, Chinnaiyan AM, Jenster GW, Sorensen KD, Tomlins S, et al. The potential of MicroRNAs as prostate cancer biomarkers. *Eur Urol* 2016;70:312–322.
273. Filella X, Foj L. miRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2016 Jan 9. pii: /j/cclm.ahead-of-print/cclm-2015-1073/cclm-2015-1073.xml. doi: 10.1515/cclm-2015-1073.
274. Stuopelytė K, Daniūnaitė K, Jankevičius F, Jarmalaitė S. Detection of miRNAs in urine of prostate cancer patients. *Medicina (Kaunas)* 2016;52:116-24.
275. Cheng HH, Mitchell PS, Kroh EM, Dowell AE, Chéry L, Siddiqui J, et al. Circulating microRNA profiling identifies a subset of metastatic prostate cancer patients with evidence of cancer associated hypoxia. *PLoS One* 2013; 8:e69239.
276. Yaman Agaoglu F, Kovancilar M, Dizdar Y, Darendeliler E, Holdenrieder S, Dalay N, et al. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour Biol* 2011;32:583–588.
277. Selth LA, Townley S, Gillis JL, Ochnik AM, Murti K, Macfarlane RJ, et al. Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease. *Int J Cancer* 2012;131:652-661.
278. Li M, Rai AJ, Joel de Castro G, Zeringer E, Barta T, Magdaleno S, et al. An optimized procedure for exosome isolation and analysis using serum samples: application to cancer biomarker discovery. *Methods* 2015;87:26-30.
279. Wang SY, Shiboski S, Belair CD, Cooperberg MR, Simko JP, Stoppler H, et al. miR-19, miR-345, miR-519c-5p serum levels predict adverse pathology in prostate cancer patients eligible for active surveillance. *PLoS One* 2014;9:e98597.
280. Guan Y, Wu Y, Liu Y, Ni J, Nong S. Association of microRNA-21 expression with clinicopathological characteristics and the risk of progression in advanced prostate cancer patients receiving androgen deprivation therapy. *Prostate* 2016;76:986-993.
281. Leite KR, Reis ST, Viana N, Morais DR, Moura CM, Silva IA, et al. Controlling reclk miR21 promotes tumor cell invasion and is related to biochemical recurrence in prostate cancer. *J Cancer* 2015;6:292–301.
282. Mishra S, Deng JJ, Gowda PS, Rao MK, Lin CL, Chen CL, et al. Androgen receptor and microRNA-21 axis downregulates transforming growth factor beta receptor II (TGFB2) expression in prostate cancer. *Oncogene* 2014;33: 4097-4106.
283. Mao XH, Chen M, Wang Y, Cui PG, Liu SB, Xu ZY. MicroRNA-21 regulates the

ERK/NF- κ B signaling pathway to affect the proliferation, migration and apoptosis of human melanoma A375 cells by targeting SPRY1, PDCD4 and PTEN. *Mol Carcinog* 2017;56:886-894.

284. Liu LZ, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, et al. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression. *PLoS ONE* 2011;6:e19139.

285. Lawson DA, Zong Y, Memarzadeh S, Xin L, Huang J, Witte ON. Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:2610-2615.

286. Ribas J, Ni X, Haffner M, Wentzel EA, Salmasi AH, Chowdhury WH, et al. MiR-21: An androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer Res* 2009;69:7165-7169.

287. Pickl JM, Tichy D, Kuryshev VY, Tolstov Y, Falkenstein M, Schüler J. Ago-RIP-Seq identifies Polycomb repressive complex I member CBX7 as a major target of miR-375 in prostate cancer progression. *Oncotarget* 2016;7:59589-59603.

288. Selth LA, Das R, Townley SL, Coutinho I, Hanson AR, Centenera MM, et al. A ZEB1-miR-375-YAP1 pathway regulates epithelial plasticity in prostate cancer. *Oncogene* 2017;36:24-34.

289. Scattoni V, Lazzeri M, Lughezzani G, de Luca S, Passera R, Bollito E, et al. Head-to-head comparison of prostate health index and urinary PCA3 for predicting cancer at initial or repeat biopsy. *J Urol* 2013;190:496-501.

290. Tallon L, Luangphakdy D, Ruffion A, Colombel M, Devonec M, Champetier D, et al. Comparative Evaluation of Urinary PCA3 and TMPRSS2:ERG Scores and Serum PHI in Predicting Prostate Cancer Aggressiveness. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 13299-13316.

291. Vedder MM, de Bekker-Grob EW, Lilja HG, Vickers AJ, van Leenders GJ, Steyerberg EW, et al. The added value of percentage of free to total Prostate-specific Antigen, PCA3, and a kallikrein panel to the ERSPC Risk Calculator for Prostate Cancer in prescreened Men. *Eur Urol* 2014; 66: 1109-1115.

292. Cantiello F, Russo GI, Ferro M, Cicione A, Cimino S, Favilla V, et al. Prognostic accuracy of Prostate Health Index and urinary Prostate Cancer Antigen 3 in predicting pathologic features after radical prostatectomy. *Urol Oncol* 2015;33:163.e15-23.

293. Mottet N, Bellmunt J, Briers E, Bolla M, Cornford P, de Santis M, et al. EAU Guidelines Prostate Cancer. Available online: <http://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/> (accessed on 9 September 2016).

BIBLIOGRAFIA

294. Vickers AJ, Eastham JA, Scardino PT, Lilja H. The Memorial Sloan Kettering Cancer Center Recommendations for Prostate Cancer Screening. *Urology* 2016; 91: 12-18.
295. De Visschere PJ, Briganti A, Fütterer JJ, Ghadjar P, Isbarn H, Massard C, et al. Role of multiparametric magnetic resonance imaging in early detection of prostate cancer. *Insights Imaging* 2016; 7: 205-214.
296. Porpiglia F, Cantiello F, de Luca S, Manfredi M, Veltri A, Russo F, et al. In-parallel comparative evaluation between multiparametric magnetic resonance imaging; prostate cancer antigen 3 and the prostate health index in predicting pathologically confirmed significant prostate cancer in men eligible for active surveillance. *BJU Int* 2016;118:527-34.
297. Washino S, Okochi T, Saito K, Konishi T, Hirai M, Kobayashi Y, et al. Combination of PI-RADS score and PSA density predicts biopsy outcome in biopsy naïve patients. *BJU Int* 2017;119:225-233.

ANNEX

Xavier Filella*, Laura Foj, Josep Maria Augé, Rafael Molina and Joan Alcover

Clinical utility of %p2PSA and prostate health index in the detection of prostate cancer

Abstract

Background: %p2PSA and prostate health index (phi) has shown valuable results in the detection of prostate cancer (PCa), improving the prediction of the aggressiveness of the tumor. The goal of the present study was to evaluate %p2PSA and phi in the detection of PCa, estimating their relationship with the aggressiveness of PCa.

Methods: A total of 354 patients with positive or negative prostatic biopsy were included. Prospectively, 150 were enrolled and 204 were enrolled retrospectively proceeding from our serum bank.

Results: The best performance was observed for %p2PSA and phi, obtaining an AUC of 0.723 and 0.732, respectively. The highest specificity at sensitivity around 90% was obtained for phi (27.4%). Using the cut-off of 31.94 for phi, a reduction of 19% biopsies could be obtained, while 17 PCa would have been missed, including only four patients with a Gleason score ≥ 7 . Similarly, using a cut-off of 1.21 for %p2PSA, a reduction of 12.7% biopsies could be obtained, while 16 PCa would have been missed, including only four patients with a Gleason score ≥ 7 . Moreover, among patients with PCa, phi (median: 69.75 vs. 48.04) and %p2PSA (median: 2.60 vs. 1.98) values are significantly higher ($p < 0.0001$) in patients with a biopsy Gleason score ≥ 7 .

Conclusions: Our results confirm previous evaluations, showing similar AUCs and results in sensitivity and specificity to other studies. %p2PSA and phi raise the accuracy in the detection of prostate cancer, reducing the number of unnecessary biopsies and improving the prediction of the aggressiveness of the tumor.

Keywords: active surveillance; prostate cancer; p2PSA; prostate health index; prostate-specific antigen (PSA).

*Corresponding author: Dr. Xavier Filella, Department of Biochemistry and Molecular Genetics CDB, Hospital Clínic, C/ Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Catalonia, Spain, Phone: +34 93 2279375, Fax: +34 93 2279376, E-mail: xfilella@clinic.cat

Laura Foj, Josep Maria Augé and Rafael Molina: Department of Biochemistry and Molecular Genetics (CDB), Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Catalonia, Spain

Joan Alcover: Department of Urology, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Catalonia, Spain

DOI 10.1515/cclm-2014-0027

Received January 7, 2014; accepted March 6, 2014; previously published online April 2, 2014

Introduction

Prostate cancer (PCa) is one of the most common male cancers in Europe, and the third most common cause of cancer death in men in Europe, after lung cancer and colorectal cancer [1]. Diagnosis of PCa is controversial because of the low positive predictive value of total prostate-specific antigen (tPSA), the test used in the detection of this tumor. Therefore, biopsy is positive in approximately only 25% of patients with PSA in the range between 2 and 10 $\mu\text{g/L}$. The percentage of free PSA (%fPSA) was proposed to differentiate benign from malignant prostate disease, improving specificity while maintaining sensitivity, especially for patients with tPSA between 2 and 10 $\mu\text{g/L}$ [2]. However, a meta-analysis published in 2006 concluded that the %fPSA improves clinical information only when levels reach extreme values [3]. Overdiagnosis and overtreatment is the major problem associated with the early diagnosis of PCa, with rates between 27% and 56% [4, 5]. Biomarkers currently used, as tPSA, can not identify aggressive PCa and therefore new biomarkers are needed in order to distinguish between patients with clinically significant and clinically insignificant PCa.

The fPSA is composed by three different fractions: benign PSA, intact inactive PSA, and proPSA [6]. The sub-fraction of proPSA is composed by various molecular isoforms, [-2], [-4] and [-5, -7] proPSA. More recently, several summaries [7–9] showed significant improvement in PCa detection by measuring [-2] proPSA (p2PSA), especially considering the derivatives %p2PSA (%p2PSA/fPSA) and prostate health index (phi), a mathematical combination of tPSA, fPSA and p2PSA according to the formula $\text{p2PSA}/\text{fPSA} \times \text{vtPSA}$. Also, according to recent investigations, %p2PSA and phi are better than tPSA or %fPSA to predict PCa aggressiveness [10, 11].

The purpose of this study was to evaluate the value of p2PSA and its derivatives (%p2PSA and phi) in the detection of PCa, estimating their assessment in the reduction

of unnecessary biopsies. Also, we evaluated the relationship between these tests and the aggressiveness of PCa.

Materials and methods

Patients

We included in our study 354 patients with positive or negative prostatic biopsy. In total 150 of these patients were enrolled prospectively between February 2012 and May 2013, and 204 were enrolled retrospectively proceeding from our bank serum. Samples proceeding from our serum bank were recruited between January 2011 and January 2012. The prospective study includes patients selected for biopsy because of an elevated serum PSA level and/or abnormal digital rectal examination, as well as patients diagnosed of prostate cancer and referred to our hospital for treatment. In all cases blood samples were obtained before any treatment. Exclusion criteria were medical therapy known to affect serum PSA serum levels, acute prostatitis or symptoms of urinary tract infection, and invasive treatment for benign prostatic hyperplasia. Transrectal ultrasound-guided biopsies were performed with ≥ 10 cores of prostatic tissue obtained. Prostate volume was available in 131 patients with negative biopsy and in 152 patients with PCa.

The study was specifically approved by the hospital Ethics Committee.

Samples

A blood sample was drawn before any prostatic manipulation. After the blood was allowed to clot for 1 h at room temperature, the samples were centrifuged at 1600 g for 15 min. The sera were aliquoted and frozen at -80°C until they were analyzed, according to the recommendations for preanalytic management of tPSA and fPSA [12] and p2PSA as previously published [13].

Laboratory methods

PSA, fPSA, and p2PSA serum levels were measured on Access 2 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) using WHO standard calibrated Access tPSA and fPSA immunoassays or the automated p2PSA assay. The analytical performance of the measurements assessed with control materials (Immunoassay Plus Bio-Rad, CA, USA, for tPSA and fPSA and Beckman Coulter for p2PSA) showed values within the recommended limits.

%p2PSA was calculated using the formula $[(\text{p2PSA pg/mL})/(\text{fPSA ng/mL} \times 1000)] \times 100$, and phi using the formula $[(\text{p2PSA pg/mL})/(\text{fPSA ng/mL})] \times \sqrt{\text{tPSA}}$.

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the normal distribution of variables. The Student's t-test and the Mann-Whitney U-test

were used for comparisons of parametric and non-parametric continuous variables, respectively. Patients were stratified according to the presence or absence of PCa at biopsy.

Predictive accuracy was quantified as the area under the ROC curve (AUC). ROC curves were used to compare specificities at given sensitivities. Statistical differences between AUCs were compared using the DeLong method [14].

The Kruskal-Wallis test was used to compare laboratory tests in relation to prostate volume. Finally, the relationship between p2PSA (and its derivatives) and a Gleason score at biopsy and clinical stage was tested by the Mann-Whitney U-test.

Statistical analyses were performed using SPSS statistics version 18.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). A two-sided p-value < 0.05 was considered significant. AUCs comparisons were performed using the software Epidat 3.1 (Santiago de Compostela, Spain).

Results

The characteristics of the patients included in our study are listed in Table 1, including information about biopsy Gleason score and clinical stage for patients with PCa. Table 2 shows the results obtained for all the biomarkers measured in this study and age. Statistical differences between patients with negative biopsy and patients with PCa were observed for fPSA, %fPSA, %p2PSA and phi, but not for tPSA and p2PSA. Median %p2PSA serum levels (2.22 vs. 1.64) and phi values (52.69 vs. 40.34) were significantly higher ($p < 0.0001$) in patients with PCa. When comparing patients included in prospective and retrospective study, no significant differences were found for all tests

Table 1 Characteristics of patients included in the study.

	Retrospective	Prospective	All patients
Number	204	150	354
Negative biopsy	109	70	179
Prostate cancer	95	80	175
Biopsy Gleason score			
≤ 6	41	41	82
7	30	29	59
≥ 8	11	10	21
No available	13	0	13
Clinical stage			
T1c	57	60	117
T2	14	15	29
T3	0	5	5
No available	24	0	24
Total PSA, $\mu\text{g/L}$			
All patients	204	150	354
0–3	3	7	10
3.1–8	143	107	250
8.1–20	52	34	86
> 20	6	2	8

Table 2 Age and results of biomarkers in patients with negative biopsy and in patients with PCa.

	Men with negative biopsy n=179		Men with positive biopsy n=175		p-Value	All evaluable men n=354	
	Range	Median	Range	Median		Range	Median
Age	38–88	68	45–88	68	0.242 ^a	38–88	68
tPSA, µg/L	2.10–26.86	6.00	1.92–36.90	6.24	0.082 ^b	1.92–36.90	6.17
fPSA, µg/L	0.26–8.22	1.15	0.20–10.18	0.84	<0.0001 ^b	0.20–10.18	1.00
%fPSA	3.85–38.5	19.17	3.86–50.83	13.09	<0.0001 ^b	3.85–50.83	16.26
p2PSA, pg/mL	4.25–87.83	17.86	3.57–280.57	18.16	0.605 ^b	3.57–280.57	17.98
%p2PSA	0.32–3.34	1.64	0.41–10.71	2.22	<0.0001 ^b	0.32–10.71	1.85
phi	16.20–119.90	40.34	5.69–252.77	52.69	<0.0001 ^b	5.69–252.77	45.53

^aStudent's t-test; ^bMann-Whitney U-test.

neither in the group of patients with negative biopsy nor in the PCa the group of patients with PCa.

The AUCs obtained for the tests evaluated in this study are shown in Figure 1. The best results were for the derivatives of p2PSA, obtaining AUCs of 0.732 and 0.723 for phi and %p2PSA, respectively. AUCs for phi

and %p2PSA significantly outperformed than tPSA ($p < 0.0001$), but not in comparison with %fPSA (Figure 1A). Figure 1B and C show the AUCs for patients included in the retrospective and prospective studies, respectively. Similar results in AUCs for all tests were obtained in both studies.

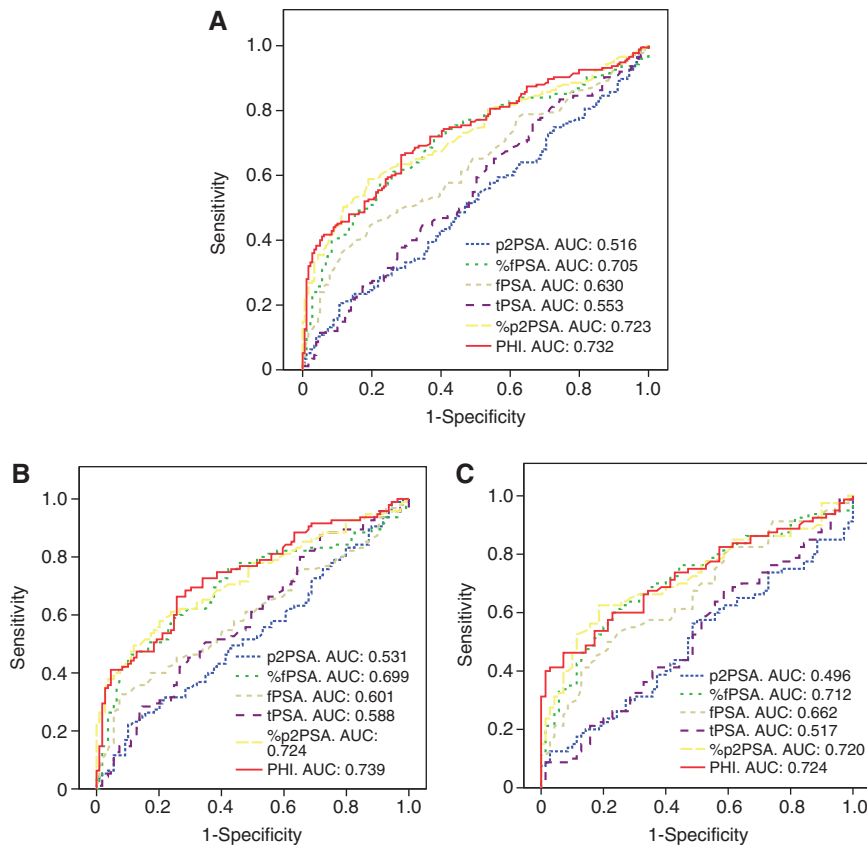


Figure 1 Receiver operating characteristic curves in all patients included in the study (A), in the retrospective study (B) and in the prospective study (C).

CI 95%: p2PSA [0.455–0.576]; %fPSA [0.650–0.760]; fPSA [0.572–0.689]; tPSA [0.493–0.613]; %p2PSA [0.670–0.777]; phi [0.680–0.785]. Retrospective study, CI 95%: p2PSA [0.451–0.611]; %fPSA [0.624–0.774]; fPSA [0.522–0.681]; tPSA [0.510–0.666]; %p2PSA [0.652–0.795]; phi [0.670–0.808]. Prospective study, CI 95%: p2PSA [0.403–0.589]; %fPSA [0.629–0.795]; fPSA [0.575–0.748]; tPSA [0.424–0.610]; %p2PSA [0.638–0.802]; phi [0.643–0.805].

Table 3 Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value for different biomarkers at several cut-offs.

Cut-off	% Sensitivity (95% CI)	% Specificity (95% CI)	PPV,%	NPV,%
Phi				
31.94	90.3 (84.9–93.9)	27.4 (21.4–34.4)	54.9	74.2
46.89	66.3 (59.0–72.9)	71.5 (64.5–77.6)	69.5	68.4
56.96	45.1 (38.0–52.5)	90 (84.6–93.6)	81.4	62.6
p2PSA, pg/mL				
9.41	90.3 (84.9–93.9)	6.1 (3.4–10.8)	48.5	39.3
18.03	51.4 (44.1–58.7)	52.5 (45.2–59.7)	51.4	52.5
35.6	15.4 (10.8–21.6)	90 (84.6–93.6)	60	52.1
%p2PSA				
1.21	90.9 (85.5–94.3)	16.2 (11.5–22.4)	51.1	61.7
2.02	58.9 (51.4–65.9)	81.0 (74.6–86.1)	75.2	66.8
2.28	44.6 (37.4–52.0)	90 (84.6–93.6)	81.3	62.4
tPSA, µg/L				
4	90.3 (84.9–93.9)	12.8 (8.7–18.6)	50.3	57.5
6.23	50.3 (43.0–57.6)	53.1 (45.8–60.2)	51.2	52.2
10.78	13.1 (8.9–19)	90 (84.6–93.6)	56.1	51.4
fPSA, µg/L				
2.36	90.3 (84.9–93.9)	11.2 (7.3–16.7)	49.8	54.1
0.89	52.0 (44.6–59.3)	66.5 (59.3–73.0)	60.3	58.6
0.66	33.1 (26.6–40.4)	90 (84.6–93.6)	76.3	57.9
%fPSA				
26.41	90.3 (84.9–93.9)	17.9 (12.9–24.2)	51.8	65.3
14.91	61.1 (53.7–68.0)	73.7 (66.8–79.6)	69.5	66.0
11.85	40.6 (33.6–48)	90 (84.6–93.6)	79.8	60.8

PNV, predictive negative value; PPV, predictive positive value.

Table 3 shows results in terms of sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value at different cut-offs, corresponding approximately to 90% sensitivity, 90% specificity and the optimum balance between sensitivity and specificity. The highest specificity at 90% sensitivity was obtained for phi (27.4%) that corresponds to the cut-off of 31.94. Specificity for %fPSA was slightly higher than specificity for %2pPSA at 90% sensitivity (17.9% vs. 16.2%, respectively).

Using a cut-off of 31.94 for phi, a reduction of 19% biopsies could be obtained, while 17 PCa would have been missed, including only four patients with a Gleason score ≥ 7 [3 with 7 (3+4) and 1 with 7 (4+3)], one of which with a clinical stage T2b. Similarly, using a cut-off of 1.21 for %p2PSA, a reduction of 12.7% biopsies could be obtained, while 16 PCa would have been missed, including only four patients with a Gleason score ≥ 7 [3 with 7 (3+4) and 1 with 7 (4+3)], one of which with a clinical stage T2b. Tables 4 and 5 list the characteristics of missed cancers in both cases, showing the biopsy Gleason score and the clinical stage of these patients. A reduction of 13.8% of biopsies could be obtained using %fPSA at a cut-off of 26.41, while 17 PCa [biopsy Gleason score: <7: 8; 7 (3+4): 4; 7 (4+3): 2; 9: 1; no available: 2] would have been missed.

Results of patients with PSA between 1.6 and 8 µg/L (corresponding to 2–10 µg/L using Hybritech calibration)

are shown in Table 6. AUCs for phi, %p2PSA and %fPSA were 0.729, 0.715 and 0.705, respectively. No significant differences were observed between these areas. Specificity of phi (22.1%) at 90% sensitivity in this group of patients was higher than specificity obtained for %p2PSA or %fPSA (11.8% for both tests).

Table 4 Characteristics of missed cancers at a phi cut-off of 31.94.

%p2PSA	phi	tPSA, µg/L	%fPSA	Age	Biopsy Gleason score	Clinical stage
0.41	5.69	1.92	45.31	80	6	T1c
1.09	21.88	4.02	26.12	62	6	T1c
0.70	22.38	10.21	20.37	74	7 (3+4)	T2b
1.08	22.83	4.46	24.89	62	6	T1c
1.18	23.30	3.87	14.73	66	6	T1c
1.06	24.33	5.28	25.19	65	6	T1c
0.92	24.91	7.27	25.45	76	6	T1c
1.16	25.16	4.72	40.89	82	NA	T1c
0.99	25.44	6.66	23.27	64	6	T1c
1.21	26.24	4.68	27.78	73	NA	T1c
1.14	26.80	5.52	36.23	78	7 (4+3)	T1c
1.16	27.8	5.76	12.85	62	6	T1c
1.19	29.14	6.02	16.28	68	7 (3+4)	T1c
0.97	30.77	10.08	16.96	73	6	T1c
1.81	30.79	2.89	21.8	63	6	T1c
1.76	31.52	3.19	24.76	71	6	T1c
1.32	31.54	5.75	12.35	68	7 (3+4)	T1c

NA, not available.

Table 5 Characteristics of missed cancers at a %p2PSA cut-off of 1.21.

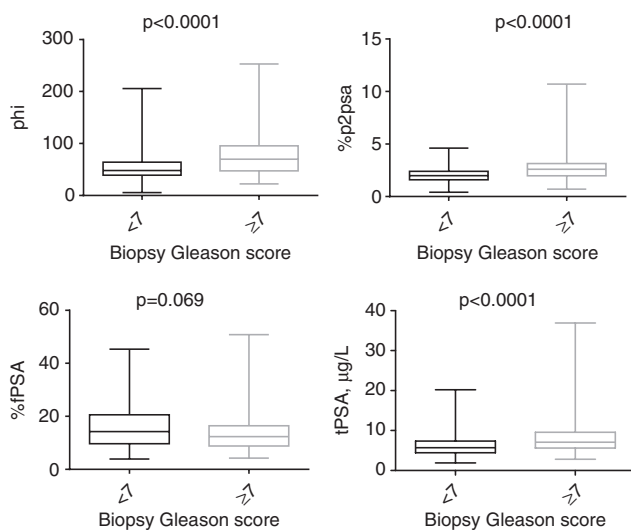
%p2PSA	phi	PSA, $\mu\text{g/L}$	%fPSA	Age, year	Biopsy Gleason score	Clinical stage
0.41	5.69	1.92	45.31	80	6	T1c
0.70	22.38	10.21	20.37	74	7 (3+4)	T2b
0.92	24.91	7.27	25.45	76	6	T1c
0.97	30.77	10.08	16.96	73	6	T1c
0.99	25.44	6.66	23.27	64	6	T1c
0.99	36.42	13.58	38.44	77	NA	NA
1.06	24.33	5.28	25.19	65	6	T1c
1.08	22.83	4.46	24.89	62	6	T1c
1.09	21.88	4.02	26.12	62	6	T1c
1.12	32.98	8.68	17.97	61	7 (3+4)	T1c
1.14	26.80	5.52	36.23	78	7 (4+3)	T1c
1.16	27.80	5.76	12.85	62	6	T1c
1.16	25.16	4.72	40.89	82	NA	T1c
1.18	23.30	3.87	14.73	66	6	T1c
1.19	29.14	6.02	16.28	68	7 (3+4)	T1c
1.20	37.34	9.63	16.1	73	NA	NA

NA, not available.

Table 6 Results in patients with PSA between 1.6 and 8 $\mu\text{g/L}$.

Cut-off	AUC	Cut-off at 90% sensitivity	% Specificity (95% CI)	PPV,%	NPV,%
Phi	0.729	30.77	22.1 (15.4–30.0)	51.4	71.4
%p2PSA	0.715	1.21	11.8 (6.9–18.4)	48.3	57.1
%fPSA	0.705	28.51	11.8 (6.9–18.4)	48.3	57.1

AUC, area under the curve; PNV, predictive negative value; PPV, predictive positive value.

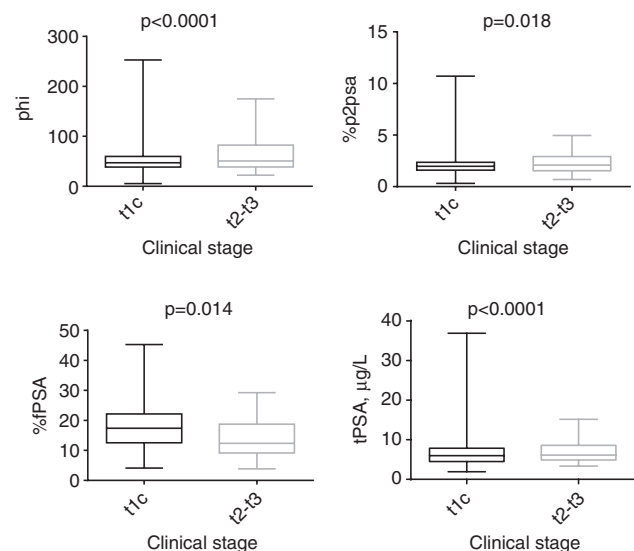
**Figure 2** Box plots comparing phi, %p2PSA, %fPSA and tPSA in relation to a biopsy Gleason score.

As described in Figure 2, among patients with PCa, phi (median: 69.75 vs. 48.04) and %p2PSA (median: 2.60 vs. 1.98) values are significantly higher in patients with a

biopsy Gleason score ≥ 7 than in patients with a biopsy Gleason score < 7 ($p < 0.0001$). Also, tPSA (median: 7.07 vs. 5.71) was significantly higher ($p < 0.0001$) in patients with a biopsy Gleason score ≥ 7 , but we did not find significant differences between both groups for %fPSA (median: 12.32 vs. 14.21). Figure 3 shows the relationship between the tests and the clinical stage. Phi (median: 50.89 vs. 47.13) and %p2PSA (median: 2.10 vs. 1.97) values were significantly higher in patients with clinical stage T2-3 than in patients with clinical stage T1c ($p < 0.0001$ and 0.018, respectively). Also, we found significant differences between both groups for tPSA (median: 6.12 vs. 5.99; $p < 0.0001$) and for %fPSA (median: 12.26 vs. 17.25; $p = 0.014$).

The ROC curves for phi and %p2PSA values comparing patients with negative biopsy and PCa patients with a biopsy Gleason score ≥ 7 are shown in Figure 4, obtaining an AUC of 0.833 and 0.813, respectively. AUCs for phi and %p2PSA significantly outperformed than tPSA ($p < 0.0001$), but not in comparison with %fPSA. Similarly, the AUCs for %p2PSA and phi were 0.835 and 0.866 (Figure 5), respectively, when we compared patients with negative biopsy and patients with PCa and clinical stage T2 or T3. However, we only found significant differences between the AUCs for phi and tPSA ($p = 0.03$).

Results corresponding to the relationship between tests and prostate volume are shown in Table 7, classifying patients in relation to the result of the biopsy. Significant differences between patients with negative biopsy and patients with PCa in all volume prostate groups were found only for phi and %p2PSA. In the group of patients

**Figure 3** Box plots comparing phi, %p2PSA, %fPSA and tPSA in relation to clinical stage.

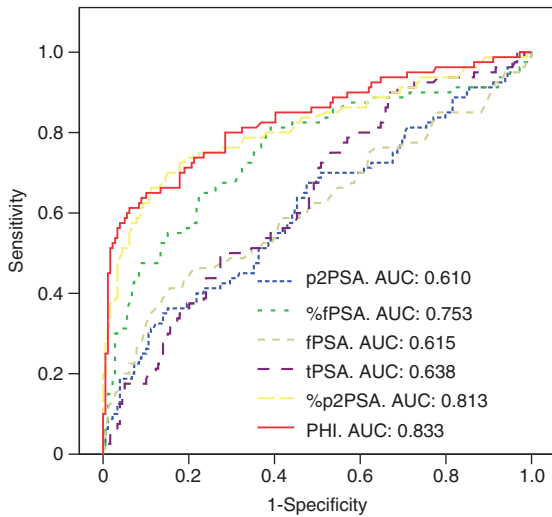


Figure 4 Receiver operating characteristic curves comparing patients with negative biopsy and prostate cancer patients with a biopsy Gleason score ≥ 7 .
CI 95%: p2PSA [0.532–0.687]; %fPSA [0.684–0.823]; fPSA [0.535–0.695]; tPSA [0.566–0.709]; %p2PSA [0.750–0.877]; phi [0.775–0.892]

with negative biopsy significant differences in relation to prostate volume were found for all tests, except for phi, that remains without statistical differences when we compared patients with small (<36), medium (36–50) or large prostates (>50). In the group of patients with PCa, phi and %p2PSA were significantly ($p < 0.0001$) higher when prostate volume was lower than 36 cm³.

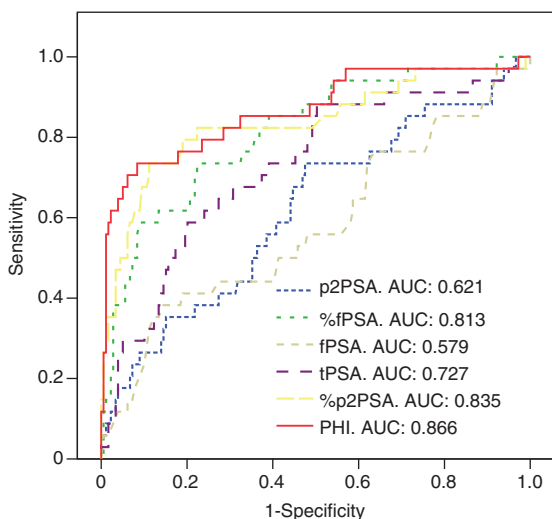


Figure 5 Receiver operating characteristic curves comparing patients with negative biopsy and patients with prostate cancer clinical stage T2 or T3.
CI 95%: p2PSA [0.513–0.728]; %fPSA [0.731–0.894]; fPSA [0.464–0.694]; tPSA [0.631–0.824]; %p2PSA [0.747–0.924]; phi [0.787–0.946]

Table 7 Influence of prostate volume in the results of biomarkers.

Prostate volume, cc	≤35			36–50			>50		
	Negative biopsy (median/range)	p-Value	PCa (median/range)	Negative biopsy (median/range)	p-Value	PCa (median/range)	Negative biopsy (median/range)	p-Value	PCa (median/range)
n	15		59	22		41	94		52
phi	41.32 (31.30–64.23)	<0.0001	68.30 (23.29–252.76)	37.97 (20.69–95.97)	0.020	45.61 (5.69–159.61)	40.22 (16.20–119.90)	0.005	47.63 (22.38–205.51)
%p2PSA	1.94 (1.17–7.44)	0.004	2.75 (1.18–10.71)	1.52 (1.01–2.62)	0.025	2.00 (0.41–5.26)	1.55 (0.32–3.34)	0.018	1.83 (0.70–4.57)
p2PSA, pg/mL	12.02 (5.63–23.37)	0.021	16.73 (6.16–78.97)	16.27 (6.37–34.81)	0.795	15.28 (3.57–280.57)	19.49 (4.25–87.83)	0.109	20.59 (10.01–116.09)
tPSA, µg/L	4.61 (0.5–12.47)	0.025	6.19 (2.72–36.9)	5.30 (2.23–26.86)	0.697	5.98 (1.92–33.54)	6.51 (3.32–25.86)	0.289	6.71 (3.19–20.22)
%fPSA	14.07 (4–24)	0.013	10.05 (4.12–23.63)	16.07 (6–39)	0.141	13.69 (3.86–45.31)	19.36 (8–38)	0.316	17.16 (6.56–50.83)
fPSA, µg/L	0.61 (0.1–1.46)	0.845	0.57 (0.20–4.65)	0.9 (0.41–2.25)	0.123	0.76 (0.28–10.18)	1.29 (0.26–8.22)	0.832	1.29 (0.43–5.22)

Significant differences in relation to prostate volume in the group of patients with PCa were found for: phi ($p < 0.0001$), %p2PSA ($p < 0.0001$), p2PSA ($p = 0.003$), %fPSA ($p < 0.0001$), fPSA ($p < 0.0001$). Significant differences in relation to prostate volume in the group of patients with negative biopsy were found for: %p2PSA ($p = 0.007$), p2PSA ($p < 0.0001$), tPSA ($p < 0.0001$), %fPSA ($p = 0.01$), fPSA ($p < 0.0001$).

Discussion

PSA is widely used in the detection of PCa, although that it is difficult to predict the presence of PCa and the biological behavior of the tumor. The earlier detection of PCa cancer has two challenges in relation to the high number of negative biopsies and the high proportion of patients diagnosed with low aggressive tumors (overdiagnosis). The introduction of %p2PSA and phi in the detection of PCa has been shown to increase the specificity of tPSA for PCa detection and they are associated with aggressive disease. This study investigated the usefulness of %p2PSA and phi in 354 patients, 150 of them prospectively recruited. Our study confirms previous results regarding both biomarkers, showing that the performance in the detection of PCa for %p2PSA and phi is higher than tPSA and %fPSA. According to a meta-analysis published in 2013 concerning 12 relevant articles evaluating these tests, the AUCs were between 0.635 and 0.78 for %fPSA and between 0.703 and 0.77 for phi [8]. More recently, a multicenter evaluation with patients prospectively and retrospectively recruited, conducted by Stephan showed AUCs of 0.72 and 0.74 for %p2PSA and phi, respectively [11]. Furthermore, a multicenter and prospective study reported AUCs of 0.67 for both biomarkers [15]. The performance of %p2PSA and phi obtained in our study was very similar, showing an AUC of 0.732 and 0.723 (0.724 and 0.720, in the prospective study), respectively, for both tests. However, the gain in predictive accuracy of %p2PSA and phi compared with %fPSA (AUC: 0.705) was not significant. Similarly, Lazzeri et al. [15] did not find differences between the AUCs for %p2PSA (0.67) and phi (0.67) and the AUC for %fPSA (0.64). However, according to Stephan et al. [11] %p2PSA (0.72) and phi (0.74) significantly outperformed %fPSA (0.61).

ROC comparison at 90% sensitivity reveals that specificity of phi in our study is higher than specificity of other tests, including %p2PSA and %fPSA (27.4% for phi, 16.2% for %p2PSA, and 17.9% for %fPSA). Consequently, the percentage of avoided biopsies was 19% for phi, 12.7% for %p2PSA and 13.8% for %fPSA using cut-offs of 31.94, 1.21 and 26.41, respectively. Our results were slightly different to those reported by Lazzeri et al. [15] showing that 17% and 15.5% of biopsies could have been avoided with the use of %p2PSA (cut-off: 1.22) and phi (cut-off: 27.6), respectively.

Comparable results were found in our study when we analyzed patients with PSA in the gray area (1.6–8 µg/L), even when a lower specificity was found for phi, %p2PSA and %fPSA in these group of patients (22.1, 11.8, and 11.8, respectively). AUCs for phi (0.729) and %p2PSA (0.715) were only slightly lower in these patients than in the global group of patients.

Results of phi and %p2PSA were higher in patients with PCa and small prostate volume (<36 cm³). However, according to our results, phi is not related to prostate volume, because results obtained in patients with negative biopsy were similar in patients with small (<36 cm³), medium (36–50 cm³) or large prostates (>50 cm³). Because of these results, phi may be particularly useful in the detection of PCa in patients with small prostate volume. Furthermore, it is remarkable that maximum differences between patients with negative biopsy and PCa in all three prostate volume groups were found for phi.

The reduction of biopsies is a key point that justifies the use of %p2PSA and phi in order to reduce morbidity as well as to reduce the economic costs related to biopsy. According to Nichol et al. [16, 17], even when the unit cost of the measurement of p2PSA is 2–3 times higher than the measurement of tPSA and fPSA, the use of %p2PSA and phi for the detection of prostate cancer decreases global costs, because the additional blood test cost is compensated by the savings on the costs of physician office visits and the avoidance of unnecessary biopsies. The savings on expected 1-year cost for prostate cancer detection in a hypothetical health plan with 100,000 male members aged 50–75 years old has been calculated in \$356,647 or \$94,219 lower when using phi rather than a PSA cut-off of 2 µg/L or 4 µg/L, respectively [17].

The value of %p2PSA and phi is particularly relevant due to the association of these biomarkers with aggressive prostate cancer. The availability of aggressiveness' biomarkers is a relevant point because a substantial proportion of new diagnosed tumors have features of clinically insignificant prostate cancer and these patients can be candidates to active surveillance [18]. In fact, the Prostate Cancer Intervention versus Observation Trial (PIVOT) study [19] showed absolute reductions in all-cause mortality with radical prostatectomy in patients with PSA higher than 10 µg/L, but not in patients with low-risk prostate cancer.

The results reported in the PIVOT study highlights the usefulness of risk factors in the management of patients with early prostate cancer to select appropriately radical treatment or active surveillance. Interestingly, Tosoian et al. [20] suggested that in men on active surveillance phi appears to provide improved prediction of biopsy reclassification during follow-up. However, several authors showed that %p2PSA and phi are related to prostate cancer aggressiveness, with higher levels of these biomarkers in patients with Gleason score 7 or higher and in patients with locally advanced tumors [21–24]. In our study we found that %p2PSA and phi are significantly higher in patients with biopsy Gleason score ≥7. No differences among these groups of patients were found in relation to

%fPSA. Also, we found a good association between elevated levels of %p2PSA and phi and clinical stage T2-3. Similar results were recently published by Stephan et al. [11] and Lazzeri et al. [15]. So, %p2PSA and phi are particularly useful in the detection of aggressive prostate cancer, showing the better performance in the detection of these tumors. In fact, the AUCs obtained in the comparison of patients with negative biopsy and PCa patients with a biopsy Gleason score ≥ 7 were 0.833 and 0.813 for phi and %p2PSA, respectively. This is an important point considering the doubts around if patients with a Gleason score 6 PCa should be really labeled as cancer [25].

Due to the relationship of %p2PSA and phi with a biopsy Gleason score, it is necessary to remark that results obtained in our study may be influenced by the high percentage of patients with a Gleason score lower than 7. The gain in AUCs for %p2PSA (0.723–0.813) and phi (0.732–0.833) was higher than the gain in AUC for %fPSA (0.705–0.753) when we compare ROC analysis considering all patients with the ROC analysis between patients with negative biopsy and patients with PCa and a biopsy Gleason score ≥ 7 (Table 4).

In summary, we found that phi was the best parameter to predict PCa in our study based on results of 354 patients, showing a relationship between %p2PSA and phi with the aggressiveness of the tumor. Our results confirm previous evaluations, finding similar AUCs and results in sensitivity and specificity to other studies, although the performance of %fPSA is slightly better than in other studies. We suggest the provisional use of the cut-offs around 32 for phi and 1.21 for %p2PSA, corresponding to the 90% sensitivity in our cohort. Certainly, even when similar cut-offs have been suggested by other authors, multi-institutional efforts are necessary in order to define the most appropriate cut-offs for both biomarkers. The implementation of these biomarkers in the clinical practice may improve the accuracy in the detection of prostate cancer, reducing the number of unnecessary biopsies and improving the prediction of the aggressiveness of the tumor.

Acknowledgments: Reagent for measurements of tPSA, fPSA and p2PSA was furnished freely by Beckman Coulter. Study was supported by grant Emili Letang from Hospital Clínic to Dr. Foj.

Conflict of interest statement

Authors' conflict of interest disclosure: The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article. Research support played no role in the study design; in the collection, analysis, and

interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

Research funding: None declared.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

References

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374–403.
2. Roddam AW, Duffy MJ, Hamdy FC, Ward AM, Patnick J, Price CP, et al. Use of prostate-specific antigen (PSA) isoforms for the detection of prostate cancer in men with a PSA level of 2–10 ng/ml: systematic review and meta-analysis. *Eur Urol* 2005;48:386–99.
3. Lee R, Localio AR, Armstrong K, Malkowicz SB, Schwartz JS. A meta-analysis of the performance characteristics of the free prostate-specific antigen test. *Urology* 2006;67:762–8.
4. Etzioni R, Penson DF, Legler JM, di Tommaso D, Boer R, Gann PH, et al. Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer Incidente Trens. *J Nat Cancer Inst* 2002;94:981–90.
5. Johansson JE, Andrén O, Andersson SO, Dickman PW, Holmberg L, Magnuson A, et al. Natural history of early, localized prostate cancer. *JAMA* 2004;291:2713–9.
6. Mikolajczyk SD, Marks LS, Partin AW, Rittenhouse HG. [Free prostate-specific antigen in serum is becoming more complex.](#) *Urology* 2002;59:797–802.
7. Hori S, Blanchet JS, McLoughlin J. From prostate-specific antigen (PSA) to precursor PSA (proPSA) isoforms: a review of the emerging role of proPSAs in the detection and management of early prostate cancer. *Br J Urol Int* 2013;112:717–28.
8. Filella X, Giménez N. Evaluation of [–2] proPSA and Prostate Health Index (phi) for the detection of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:729–39.
9. Melichar B. PSA, PCA3 and the philosophy of prostate cancer management. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:707–12.
10. Catalona WJ, Partin AW, Sanda MG, Wei JT, Klee GG, Bangma CH, et al. A multicenter study of [–2]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *J Urol* 2011;185:1650–5.
11. Stephan C, Vincendeau S, Houlgatte A, Cammann H, Jung K, Semjonow A. Multicenter evaluation of [–2]proprostate-specific antigen and the prostate health index for detecting prostate cancer. *Clin Chem* 2013;59:306–14.
12. Quality Requirements & Control Guidelines. European Group on Tumor Markers. Available from: http://www.egtm.eu/information_for_patients/quality_requirements_and_control.
13. Semjonow A, Kopke T, Eltze E, Pepping-Schefers B, Burgel H, Darte C. Pre-analytical in-vitro stability of [–2]proPSA in blood and serum. *Clin Biochem* 2010;43:926–8.
14. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating

- characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988;44:837–45.
15. Lazzeri M, Haese A, de la Taille A, Palou Redorta J, McNicholas T, Lughezzani G, et al. Serum isoform [-2]proPSA derivatives significantly improve prediction of prostate cancer at initial biopsy in a total PSA range of 2–10 ng/ml: a multicentric European study. *Eur Urol* 2013;63:986–94.
 16. Nichol MB, Wu J, Huang J, Denham D, Frencher SK, Jacobsen SJ. Cost-effectiveness of Prostate Health Index for prostate cancer detection. *Br J Urol Int* 2011;110:353–62.
 17. Nichol MB, Wu J, An JJ, Huang J, Denham D, Frencher S, et al. Budget impact analysis of a new prostate cancer risk index for prostate cancer detection. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2011;14:253–61.
 18. Klotz L. Active surveillance for prostate cancer: overview and update. *Curr Treat Options Oncol* 2013;14:97–108.
 19. Wilt TJ, Brawer MK, Jones KM, Barry MJ, Aronson WJ, Fox S, et al. Prostate Cancer Intervention versus Observation Trial (PIVOT) Study Group. Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer. *N Engl J Med* 2012;367:203–13.
 20. Tosoian JJ, Loeb S, Feng Z, Isharwal S, Landis P, Elliot DJ, et al. Association of [-2]proPSA with biopsy reclassification during active surveillance for prostate cancer. *J Urol* 2012;188:1131–6.
 21. Jansen FH, van Schaik RH, Kurstjens J, Horninger W, Klocker H, Bektic J, et al. Prostate-specific antigen (PSA) isoform p2PSA in combination with total PSA and free PSA improves diagnostic accuracy in prostate cancer detection. *Eur Urol* 2010;57:921–7.
 22. Guazzoni G, Nava L, Lazzeri M, Scattoni V, Lughezzani G, Maccagnano C, et al. Prostate-specific antigen (PSA) isoform p2PSA significantly improves the prediction of prostate cancer at initial extended prostate biopsies in patients with total PSA between 2.0 and 10 ng/ml: results of a prospective study in a clinical setting. *Eur Urol* 2011;60:214–22.
 23. Sokoll LJ, Sanda MG, Feng Z, Kagan J, Mizrahi IA, Broyles DL, et al. A prospective, multicenter, National Cancer Institute Early Detection Research Network study of [-2]proPSA: improving prostate cancer detection and correlating with cancer aggressiveness. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1193–200.
 24. Stephan C, Kahrs AM, Cammann H, Lein M, Schrader M, Deger S, et al. A [-2]proPSA-based artificial neural network significantly improves differentiation between prostate cancer and benign prostatic diseases. *Prostate* 2009;69:198–207.
 25. Carter HB, Partin AW, Walsh PC, Trock BJ, Veltri RW, Nelson WG, et al. Gleason score 6 adenocarcinoma: should it be labeled as cancer? *J Clin Oncol* 2012;30:4294–6.



The influence of prostate volume in prostate health index performance in patients with total PSA lower than 10 µg/L



Xavier Filella^{a,*}, Laura Foj^a, Joan Alcover^b, Josep Maria Augé^a, Rafael Molina^a, Wladimiro Jiménez^a

^a Department of Biochemistry and Molecular Genetics (CDB), Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Catalonia, Spain

^b Department of Urology, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 May 2014

Received in revised form 19 June 2014

Accepted 20 June 2014

Available online 27 June 2014

Keywords:

Prostate cancer

Prostate health index

PSA

p2PSA

Prostate volume

ABSTRACT

Prostate health index (phi), a measure calculated as $p2PSA/fPSA \times \sqrt{tPSA}$, has shown valuable results in the detection of prostate cancer (PCa), improving the prediction of the aggressiveness of the tumor. The aim of our study was to test whether prostate volume influences phi performance using univariate and multivariate models. 220 patients with PSA < 10 µg/L (102 with negative biopsy and 118 with PCa) were included in the study. Serum concentrations of tPSA, fPSA and p2PSA were measured on Access2 analyzer. The higher accuracy was found for phi, obtaining an AUC of 0.748. Bigger AUCs were obtained for phi, %p2PSA, %fPSA and tPSA in patients with small prostate volume (≤ 35 cc); meanwhile, the lowest AUCs were found in patients with large prostate volume (> 50 cc). Including phi and %p2PSA in a multivariable analysis based on patient age, prostate volume, tPSA, and %fPSA accuracy increased from 0.762 to 0.802 (logistic regression model) or 0.815 (artificial neural network). Accuracy excluding prostate volume in these models was 0.762 and 0.775, respectively. The inclusion of phi and %p2PSA in a multivariate model identifies better men with PCa. Prostate volume remains a key factor in the interpretation of biomarkers used to detect PCa.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most frequent cancer among males in Western countries. In Europe, an incidence of 416,700 new cases and a mortality of 92,200 cancer deaths per year have been reported in 2012 [1]. Total prostate-specific antigen (tPSA) remains as the most used biomarker in the management of early PCa. However, false positive results have been reported in patients with benign prostatic hyperplasia. Furthermore, because of its low specificity, its use as single biomarker is questionable. Biopsy is negative in approximately 75% of patients with tPSA between 2 and 10 µg/L. Moreover, the widespread use of tPSA screening has led to earlier detection, but with a high rate of overdiagnosis, showing prolonged survival without significantly reducing mortality.

New strategies to increase the specificity of tPSA have been described since the description of a new assay for the measurement of [−2] proPSA (p2PSA), the most stable proPSA isoform. Several studies showed that prostate health index (phi), a mathematical combination of tPSA, fPSA

and p2PSA according to the formula $p2PSA/fPSA \times \sqrt{tPSA}$, may improve the detection of PCa, reducing false negative biopsies and distinguishing patients with aggressive PCa. According to a meta-analysis published in 2013 concerning 12 relevant articles evaluating these tests, the AUCs were between 0.635 and 0.78 for %p2PSA and between 0.703 and 0.77 for phi [2]. In addition, more recent studies have confirmed these results [3,4].

The combination of several clinical and laboratory variables has been proposed to improve the sensitivity and specificity to detect PCa in patients with intermediate levels of tPSA. Logistic regression models and artificial neural networks have been developed to integrate these variables to predict biopsy outcomes. Recent studies remark that the inclusion of phi in a multivariate model increases the accuracy in the prediction of prostate biopsy outcome [3–5].

The purpose of our study was to develop a multivariate model incorporating %p2PSA and phi to predict PCa in patients with tPSA lower than 10 µg/L, as well as to study the influence of prostate volume in the accuracy of these models.

2. Patients and methods

2.1. Patients

220 subjects with PSA lower than 10 µg/L were enrolled in our study between January 2011 and June 2013. Patients were selected for biopsy

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Molecular Genetics (CDB), Hospital Clínic, C/Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: +34 93 227 93 75; fax: +34 93 227 93 76.

E-mail address: xfilella@clinic.cat (X. Filella).

Table 1
Descriptive characteristics of the study population.

	Patients with negative biopsy		p	Patients with PCa		All patients	
	Median (range)			Median (range)	Median (range)		
Number of patients	102		–	118		220	
Patient age	67 (38–78)		0.617 ^a	65 (45–82)		66 (38–82)	
Prostate volume	64.25 (19–170)		<0.0001 ^b	41.0 (15.4–137)		49 (15.4–170)	
tPSA (µg/L)	5.65 (2.10–9.77)		0.838 ^b	5.91 (2.72–9.91)		5.76 (2.10–9.91)	
%fPSA	18.25 (7.51–38.16)		<0.0001 ^b	13.3 (3.86–50.83)		15.34 (3.86–50.83)	
p2PSA (pg/mL)	16.7 (4.25–50.66)		0.767 ^b	17.37 (6.16–74.97)		17.15 (4.25–74.97)	
%p2PSA	1.60 (0.87–2.86)		<0.0001 ^b	2.22 (0.99–10.71)		1.88 (0.87–10.71)	
Phi	38.35 (19.23–72.63)		<0.0001 ^b	50.96 (21.88–252.77)		44.57 (19.23–252.77)	

^a *t* Student.

^b *U* Mann–Whitney.

because of an elevated serum PSA level and/or abnormal digital rectal examination. 102 subjects had a negative biopsy and 118 had PCa, including 60 patients with biopsy Gleason score lower than 7 and 50 patients with biopsy Gleason score equal or higher than 7. There was no available information related to the Gleason score of 8 patients. In all cases blood samples were obtained before any treatment. Exclusion criteria were medical therapy known to affect tPSA serum levels, chronic renal failure, acute prostatitis or symptoms of urinary tract infection, and invasive treatment for benign prostatic hyperplasia. Transrectal ultrasound-guided biopsies were performed with ≥ 10 cores of prostatic tissue obtained. Prostate volumes were calculated by ultrasound measurement, using the ellipsoid formula. The study was approved by the hospital ethics committee.

2.2. Samples

A blood sample was drawn before any prostatic manipulation. Serum was centrifuged within 3 h of phlebotomy and frozen at – 80 °C until tests were analyzed, according to the recommendations for preanalytic management of tPSA and fPSA [6] and published data about p2PSA [7].

2.3. Laboratory methods

tPSA, fPSA, and p2PSA serum levels were measured on Access2 analyzer (Beckman Coulter, Brea, CA). WHO standards were used in the measurement of tPSA and fPSA. %p2PSA was calculated using the formula [(p2PSA pg/ml)/(fPSA µg/L × 1000)] × 100. Phi was calculated using the formula [(p2PSA pg/ml)/(fPSA µg/L)] × √tPSA (µg/L).

2.4. Statistical analysis

The Kolmogorov–Smirnov test was used to assess the normal distribution of variables. The Student *t* test and the *U* Mann–Whitney test were used for comparisons of parametric and nonparametric continuous variables, respectively. Predictive accuracy was quantified as the area under the ROC curve (AUC). Statistical differences between AUCs were compared using the DeLong method [8].

To test the ability of phi and %p2PSA to improve the accuracy in detecting PCa at biopsy, these variables were used together in a multivariate logistic regression (LR) model and an artificial neural network (ANN) model with patient age, PSA, %fPSA and prostate volume.

Table 2
Results of biomarkers according to prostate volume.

Prostate volume (cc)	≤35			36–50			>50		
	Negative biopsy (median/range)	p	PCa (median/range)	Negative biopsy (median/range)	p	PCa (median/range)	Negative biopsy (median/range)	p	PCa (median/range)
PSA < 10									
n	11		48	18		34	73		36
Phi	41.32 (31.30–64.23)	0.001	64.93 (23.30–252.76)	35.38 (20.69–49.80)	0.011	44.56 (21.88–132.72)	38.34 (19.23–72.63)	0.009	46.28 (24.33–80.34)
%p2PSA	2.01 (1.55–2.82)	0.006	2.75 (1.18–10.71)	1.46 (1.01–2.62)	0.036	1.94 (0.99–5.26)	1.53 (0.87–2.86)	0.014	1.83 (1.06–3.65)
p2PSA (pg/mL)	12.31 (6.72–20.58)	0.243	14.52 (6.16–74.97)	14.70 (6.37–28.46)	0.590	13.84 (7.53–35.60)	18.03 (4.25–50.66)	0.048	20.32 (10.01–71.98)
tPSA (µg/L)	4.61 (2.1–6.51)	0.067	5.60 (2.72–9.64)	5.08 (2.23–9.77)	0.526	5.87 (3.52–8.07)	6.21 (3.32–9.38)	0.680	6.01 (3.19–9.91)
%fPSA	12.75(9.54–23.81)	0.026	9.86 (4.12–21.80)	17.44 (10.37–30.74)	0.065	13.39 (3.86–32.96)	19.07 (7.51–38.16)	0.767	18.24 (9.97–50.83)
fPSA (µg/L)	0.61 (0.39–0.89)	0.448	0.53 (0.20–1.44)	0.87 (0.41–2.25)	0.172	0.75 (0.28–2.04)	1.19 (0.26–3.11)	0.782	1.26 (0.49–3.97)

Significant differences in relation to prostate volume in the group of patients with PCa were found for: phi (*p* < 0.0001), %p2PSA (*p* < 0.0001), p2PSA (*p* = 0.001), %fPSA (*p* < 0.0001), fPSA (*p* < 0.0001). No differences were found for PSA (*p* = 0.429).

Significant differences in relation to prostate volume in the group of patients with negative biopsy were found for: %p2PSA (*p* = 0.004), p2PSA (*p* = 0.006), tPSA (*p* = 0.01), %fPSA (*p* = 0.01), fPSA (*p* < 0.0001). No differences were found for phi (*p* = 0.127).

Table 3
AUCs for tPSA, %fPSA, %p2PSA and phi.

Prostate volume (cc)	≤35	36–50	>50	All patients
	AUC (95% CI)	AUC (95% CI)	AUC (95% CI)	AUC (95% CI)
Phi	0.818 (0.704–0.933)	0.716 (0.577–0.855)	0.654 (0.543–0.766)	0.748 (0.684–0.812)
%p2PSA	0.767 (0.637–0.897)	0.678 (0.523–0.833)	0.646 (0.531–0.760)	0.743 (0.678–0.807)
tPSA (µg/L)	0.678 (0.529–0.827)	0.554 (0.359–0.748)	0.524 (0.402–0.646)	0.508 (0.431–0.585)
%fPSA	0.717 (0.568–0.865)	0.657 (0.504–0.810)	0.518 (0.396–0.639)	0.700 (0.631–0.768)

Table 4
Multivariate analysis in the prediction of PCa.

	With prostate volume	Without prostate volume
	AUC (95% CI)	AUC (95% CI)
Base model (LR)	0.762 (0.700–0.825)	0.695 (0.626–0.765)
Base model + %p2PSA (LR)	0.792 (0.733–0.851)	0.760 (0.696–0.823)
Base model + phi (LR)	0.796 (0.738–0.855)	0.762 (0.699–0.825)
Base model + phi + %p2PSA (LR)	0.802 (0.744–0.859)	0.762 (0.700–0.825)
Base model + phi + %p2psa (ANN)	0.815 (0.759–0.870)	0.775 (0.715–0.836)

Base model: tPSA, %fPSA, patient age, with or without prostate volume.
LR: logistic regression model; ANN: artificial neural network model.
AUC: area under the curve; CI: confidence interval.

Multivariable models were complemented by decision curve analysis (DCA) [9].

Statistical analyses were performed using IBM-SPSS® version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA, 2011). A two-sided p value <0.05 was considered to indicate statistical significance. ANN models were constructed with NeuroXL predictor-software (OLSOFT, Moscow, Russia). Decision curves were plotted using R (www.r-project.org).

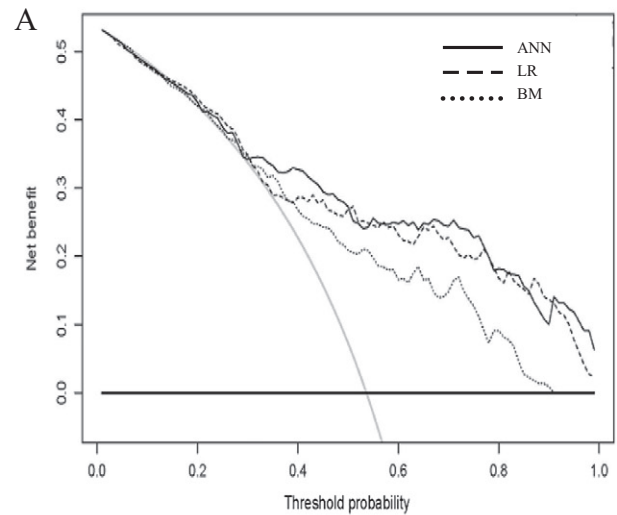
3. Results

Patient characteristics are shown in Table 1. tPSA ranged from 2.1 to 9.77 $\mu\text{g/L}$ in the group of patients with negative biopsy and from 2.72 to 9.91 $\mu\text{g/L}$ in the group of patients with PCa. Median tPSA did not differ between both groups of patients. Significant statistical differences between patients with negative biopsy and patients with PCa were observed for prostate volume, %fPSA, %p2PSA and phi.

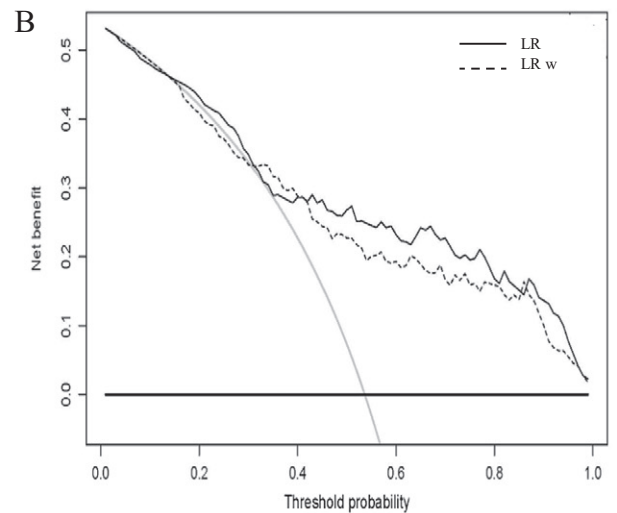
Median serum levels and ranges for all biomarkers classifying patients according to prostate volume in three groups are shown in Table 2. Significant differences between patients with negative biopsy and patients with PCa were found for %fPSA, %p2PSA and phi in the group of patients with small prostate volume (≤ 35 cc). Furthermore, in the groups of patients with medium prostate volume (36–50 cc) and with large prostate volume (>50 cc) we found significant differences between patients with negative biopsy and patients with PCa for %p2PSA and phi. When we compared patients with negative biopsy according to prostate volume, statistical differences between the three groups of patients were found for all biomarkers, with the exception of phi. Similarly, comparing patients with PCa according to prostate volume, significant differences were found for all biomarkers, except for tPSA.

The AUCs obtained for the tests evaluated in this study are shown in Table 3. The best results were found for phi and %p2PSA, obtaining AUCs of 0.748 and 0.743, respectively. AUCs for phi and %p2PSA significantly outperformed tPSA ($p < 0.0001$), but not %fPSA. The AUCs for the study subjects based on prostate volume can be also seen in Table 3. Bigger areas were obtained for all biomarkers in patients with small prostate volume; meanwhile, the lowest areas were found in patients with large prostate volume.

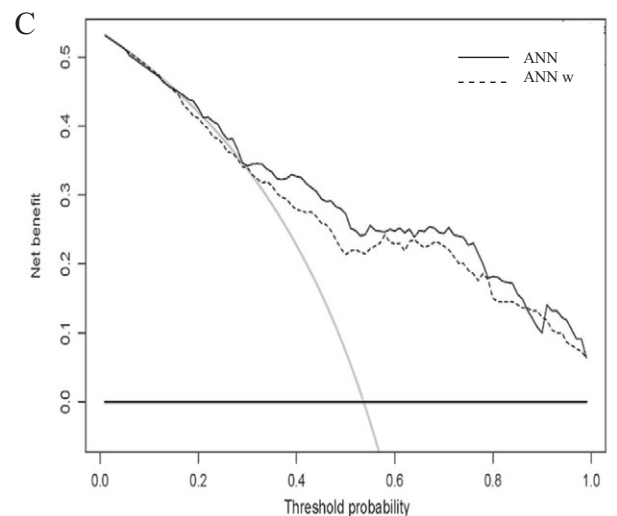
Table 4 shows the results of the multivariate analysis. The AUC obtained using a logistic regression analysis for a base model including tPSA, %fPSA, patient age and prostate volume was 0.762. This value



BM: Base model (Volume + age + %fPSA + tPSA)
LR: Logistic regression (Base model + phi + %p2PSA)
ANN: Neural Network (Base model + phi + %p2PSA)



LR: Logistic regression (Base model + phi + %p2PSA)
LR w: Logistic regression (Base model without prostate volume + phi + %p2PSA)



ANN: Neural Network (Base model + phi + %p2PSA)
ANN w: Neural Network (Base model without prostate volume + phi + %p2PSA)

Fig. 1. Decision curve analysis. A: DCA comparing the base model with the complete model (adding %p2PSA and phi using LR and ANN). B: DCA comparing the LR model including or not the prostate volume. C: DCA comparing the ANN model including or not the prostate volume.

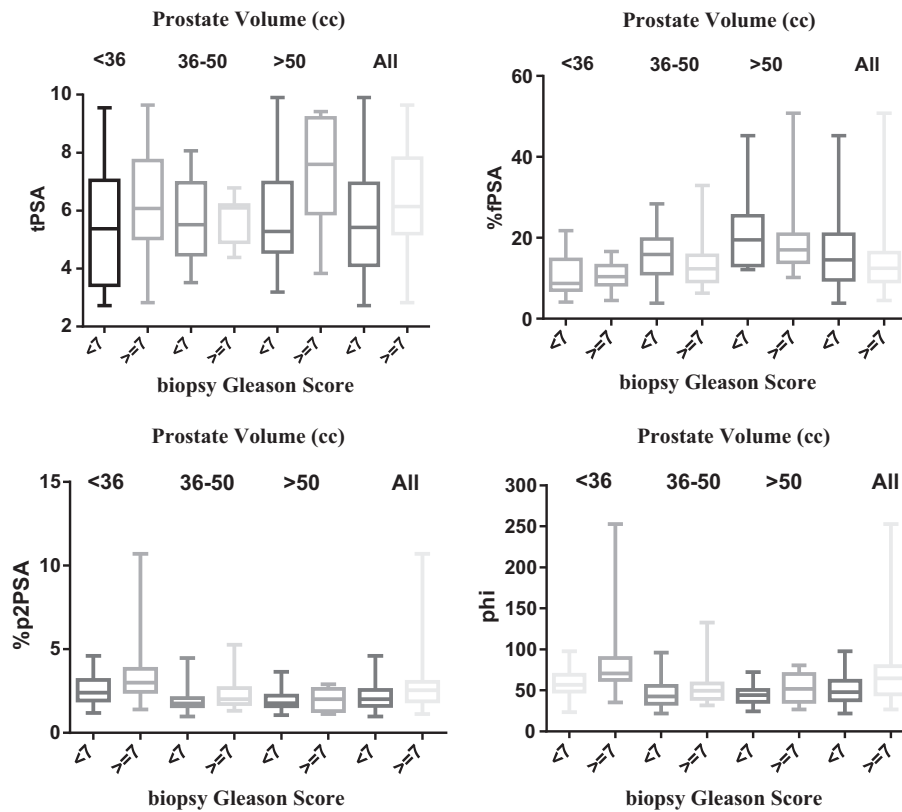


Fig. 2. Relationship between biomarkers and biopsy Gleason score.

increased by adding %p2PSA (0.792), phi (0.796) or both (0.802) to the base model. Finally, an AUC of 0.815 was found using an artificial neural network including all variables. This table also includes the AUCs observed for the same models excluding prostate volume in the assessment, finding that predictive accuracy decreased in all cases.

A DCA was performed comparing the base model with the same model but adding %p2PSA and phi (Fig. 1A). We obtained a net benefit when %p2PSA and phi were included using a logistic regression analysis as well as using an artificial neural network. Fig. 1B and C shows respectively the DCA obtained for the LR and ANN model, including or not including the prostate volume. Net benefit increased when prostate volume was included in the models.

The relationship between biomarkers and biopsy Gleason score is shown in Fig. 2. Significant higher levels of tPSA, %p2PSA and phi were found in patients with biopsy Gleason score ≥ 7 in comparison with patients with biopsy Gleason score < 7 , while no significant differences were found for %fPSA. This figure also shows the relationship between biomarkers and prostate volume classifying patients in relation to biopsy Gleason score. Significant differences in relation to prostate volume were found for phi and %p2PSA in patients with Gleason score ≥ 7 ($p = 0.003$ and $p < 0.001$, respectively) as well as in patients with biopsy Gleason score < 7 ($p = 0.014$ and 0.007 , respectively). Also, significant differences were appreciated in both groups of patients for %fPSA ($p < 0.001$, in both cases).

4. Discussion

Earlier detection of PCa in the PSA era has brought new challenges to clinical assessment and treatment selection. The U.S. Preventive Services Task Force presented new controversial recommendations about the use of tPSA in the screening of PCa, citing small or no reduction in prostate cancer-specific mortality, and harms related to

subsequent evaluation and treatments, some of which may be unnecessary [10]. Despite its deficiencies, tPSA remains as the most used biomarker for PCa. However, results published in last years concerning %p2PSA and phi, two derivatives of p2PSA, demonstrated superior specificity than tPSA, showing their potential use reducing unnecessary biopsies and improving the prediction of the aggressiveness of the tumor. AUCs for %p2PSA and phi have been reported respectively from 0.635 to 0.780 and from 0.703 to 0.770 [2]. A recent multicenter evaluation, including 1362 patients with tPSA between 1.6 and 8 $\mu\text{g/L}$, showed AUCs of 0.72 and 0.74 for %p2PSA and phi, respectively [3]. Furthermore, a prospective European study including 646 patients with tPSA between 2 and 10 $\mu\text{g/L}$ showed AUCs of 0.67 for both biomarkers [4].

Our group in a previous study including patients with tPSA between 1.92 and 36.90 $\mu\text{g/L}$ obtained similar results, showing AUCs of 0.723 and 0.732 for %p2PSA and phi, respectively [11]. In the present study, we evaluated the derivatives of p2PSA in patients with tPSA lower than 10 $\mu\text{g/L}$ using a univariate and multivariate analysis, which included a logistic regression model and an artificial neural network. The univariate analysis showed similar results than those of published studies, demonstrating the biggest AUC for phi (0.748). Also, we obtained an association of phi and %p2PSA with biopsy Gleason score, as described previously in other studies [3,4,12,13].

Interestingly, phi is not related to prostate volume in patients with negative biopsy, while this association was observed for the others biomarkers. In contrast, in patients with PCa significant differences were found for all biomarkers, with the exception of tPSA. As a consequence, our results remark differences in accuracy for these biomarkers in relation to prostate volume. So, the performance of phi changed in relation to prostate volume, finding AUCs of 0.818, 0.716 and 0.654 for patients with small, medium and large prostate volume, respectively. These data disagree with previous results reported by Catalona et al. [12] indicating

that phi is not associated with prostate volume, and showing similar AUCs for patients with prostate volume ≤ 38 cc (0.693), 39–53 cc (0.707) and ≥ 54 cc (0.642). We have not explanation for these discrepant results, although the median of prostate volume in patients with negative biopsy was higher in our study (64.25 vs 51 cc). Further studies are necessary to confirm the higher accuracy of phi in patients with small prostate volume.

The combination of multiple biomarkers for the detection of PCa has been proposed by Mikolajczyk et al. [14] in 2004, considering that this reflects the multidimensional nature of prostate disease which ranges from metastatic cancer to benign hyperplasia and inflammation. Our results demonstrated this approximation, improving the accuracy in the detection of PCa when a multivariate model was used, particularly when prostate volume was included.

Using a decision analytic approach, we have demonstrated that the use of models including phi and %p2PSA can importantly improve accuracy obtained with a base model. The use of a multivariate model including %p2PSA was suggested initially by Sokoll [15], obtaining an AUC of 0.76 for patients with tPSA from 2 to 10 $\mu\text{g/L}$. This model included tPSA, %fPSA and %p2PSA, together with several clinical and demographic factors, but not prostate volume. Also, Stephan et al. [16] proposed a multivariate model, constructed using LR and ANN, indicating that no improvement was obtained when prostate volume was included into the model.

However, a second study conducted by Stephan [3] improved accuracy in detection of PCa adding %p2PSA (AUC: 0.75) or phi (AUC: 0.75) to a multivariate model based on patient age, prostate volume, digital rectal examination, tPSA and %fPSA (AUC: 0.69). Prostate volume was also included in the multivariate model described by Guazzoni et al. [13] showing a gain in the predictive accuracy of 0.10 or 0.11, respectively, when %p2PSA (AUC: 0.82) or phi (AUC: 0.83) was added to a base model including patient age, prostate volume, tPSA and %fPSA (AUC: 0.72).

Some differences are observed in our study in relation to previously published results. We obtained a bigger AUC for the base model, including patient age, prostate volume, tPSA and %fPSA (0.762), probably because the AUC for %fPSA is higher in our study: 0.70 versus 0.61 reported by Stephan et al. [3], and 0.58 reported by Guazzoni et al. [13]. However, our results are comparable with published results when %p2PSA and phi were added to the base model, obtaining a similar gain (0.053 and 0.040, using LR and ANN, respectively) to those reported by Stephan et al. [3] (0.06 as well as including %fPSA or phi) and Guazzoni et al. [13] (0.10 and 0.11 including %fPSA and phi, respectively).

Our study highlights the meaning of prostate volume in the interpretation of prostate cancer biomarkers. The AUCs obtained using a multivariate analysis demonstrated lower values for all models when prostate volume was excluded. Also, we observed differences in ROC curves according to prostate volume, obtaining the biggest accuracy for all biomarkers in patients with small prostate volume. The reported results remark the relationship of phi with prostate volume in patients with PCa, but not in patients with negative biopsy. This is a characteristic feature of phi in contrast with the other biomarkers evaluated in this study. On the other hand, in patients with PCa, Phi values were significantly higher in patients with small prostate volume than in patients with medium or large prostates. This trend was also observed when patients with PCa were classified according to biopsy Gleason score in two groups. Results reported in this study agree with previous studies demonstrating the higher accuracy of %p2PSA and phi to detect PCa, showing a positive association with the aggressiveness of the tumor.

In conclusion, accuracy for detecting PCa improved including phi and %p2PSA in a multivariate model, obtaining AUCs of 0.802 and

0.815 using LR analysis or ANN, respectively. Certainly, new efforts are necessary to discover new tests specifically related to PCa in order to further increase present day accuracy. However, prostate volume remains a key factor in the interpretation of biomarkers used to detect PCa. So, we need serum biomarkers related to prostate volume to substitute transrectal ultrasound.

Acknowledgments

Reagent for measurements of tPSA, fPSA and p2PSA was furnished freely by Beckmann Coulter. Study was supported by grant Emili Letang from Hospital Clínic to Dr. Foj. This work was supported by grants to W. Jiménez from Ministerio de Economía y Competitividad (SAF12-35979), cofinanced by FEDER, European Union, a way of making Europe.

References

- [1] Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374–403.
- [2] Filella X, Giménez N. Evaluation of [–2] proPSA and Prostate Health Index (phi) for the detection of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:729–39.
- [3] Stephan C, Vincendeau S, Houlgatte A, Cammann H, Jung K, Semjonow A. Multicenter evaluation of [–2] proprostate-specific antigen and the prostate health index for detecting prostate cancer. *Clin Chem* 2013;59:306–14.
- [4] Lazzeri M, Haese A, de la Taille A, Palou Redorta J, McNicholas T, Lughezzani G, et al. Serum isoform [–2]proPSA derivatives significantly improve prediction of prostate cancer at initial biopsy in a total PSA range of 2–10 ng/ml: a multicentric European study. *Eur Urol* 2013;63:986–94.
- [5] Lughezzani G, Lazzeri M, Larcher A, Lista G, Scattoni V, Cestari A, et al. Development and internal validation of a Prostate Health Index based nomogram for predicting prostate cancer at extended biopsy. *J Urol* 2012;188:1144–50.
- [6] Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, Lilja H, Brünner N, Chan DW, et al. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clin Chem* 2008;54:e11–79.
- [7] Semjonow A, Kopke T, Eltze E, Pepping-Schepfers B, Burgel H, Darte C. Pre-analytical in-vitro stability of [–2]proPSA in blood and serum. *Clin Biochem* 2010;43:926–8.
- [8] DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988;44:837–45.
- [9] Vickers AJ, Elkin EB. Decision curve analysis: a novel method for evaluating prediction models. *Med Decis Making* 2006;26:565–74.
- [10] Chou R, Crosswell JM, Dana T, Bougatsos C, Blazina I, Fu R, et al. Screening for prostate cancer: a review of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2011;155:762–71.
- [11] Filella X, Foj L, Augé JM, Molina R, Alcover J. Clinical utility of %p2PSA and prostate health index in the detection of prostate cancer. *Clin Chem Lab Med* Apr 2 2014. <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2014-0027> [pii:/j/cclm.ahead-of-print/cclm-2014-0027/cclm-2014-0027.xml].
- [12] Catalona WJ, Partin AW, Sanda MG, Wei JT, Klee GG, Bangma CH, et al. A multicenter study of [–2] pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *J Urol* 2011;185:1650–5.
- [13] Guazzoni G, Nava L, Lazzeri M, Scattoni V, Lughezzani G, Maccagnano C, et al. Prostate-specific antigen (PSA) isoform p2PSA significantly improves the prediction of prostate cancer at initial extended prostate biopsies in patients with total PSA between 2.0 and 10 ng/ml: results of a prospective study in a clinical setting. *Eur Urol* 2011;60:214–22.
- [14] Mikolajczyk SD, Song Y, Wong JR, Matson RS, Rittenhouse HG. Are multiple markers the future of prostate cancer diagnostics? *Clin Biochem* 2004;37:519–28.
- [15] Sokoll LJ, Sanda MG, Feng Z, Kagan J, Mizrahi IA, Broyles DL, et al. A prospective, multicenter, National Cancer Institute Early Detection Research Network study of [–2] proPSA: improving prostate cancer detection and correlating with cancer aggressiveness. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1193–200.
- [16] Stephan C, Kahrs AM, Cammann H, Lein M, Schrader M, Deger S, et al. A [–2] proPSA-based artificial neural network significantly improves differentiation between prostate cancer and benign prostatic diseases. *Prostate* 2009;69:198–207.



Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinchim

Real-time PCR *PCA3* assay is a useful test measured in urine to improve prostate cancer detection



Laura Foj^a, Montserrat Milà^a, Lourdes Mengual^b, Pilar Luque^b, Antonio Alcaraz^b, Wladimiro Jiménez^a, Xavier Filella^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Genetics (CDB), Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Catalonia, Spain

^b Laboratory and Department of Urology, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2014

Received in revised form 25 April 2014

Accepted 25 April 2014

Available online 5 May 2014

Keywords:

Prostate cancer

PCA3

PSA

Urinary biomarkers

ABSTRACT

Background: The usefulness of *PCA3* in the management of early prostate cancer (PCa) is on debate. The aim of this study was to evaluate *PCA3* in the detection of PCa and its relationship with tumor aggressiveness.

Methods and patients: *PCA3* score was measured by real time PCR in urinary sediments of 122 patients who underwent prostate biopsy for PSA >4 µg/L.

Results: Analysis of ROC curves showed an area under the curve (AUC) of 0.804 for *PCA3* score, while the AUCs were 0.587 and 0.697 for PSA and % free PSA, respectively. The probability of positive biopsy increased in relation to *PCA3* score, with variations from 37% to 96% for patients with *PCA3* score lower than 0.90 or higher than 1.04, respectively. We chose the cut-off value of 0.90, corresponding to a sensitivity of 92.5%, for which we obtained a specificity of 41.5%. No significant differences in *PCA3* score were found in relation to Gleason score or clinical stage.

Conclusions: The results show a high probability of PCa in patients with an elevated *PCA3* score, although we did not find any relationship with aggressiveness of the tumor. *PCA3* score can help to select more precisely which patients will need to perform a biopsy of the prostate.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most frequent cancer among males. In Europe, an incidence of 416,700 new cases and a mortality of 92,200 per year have been reported in 2012. It is responsible for more male deaths than any other cancer, with the exceptions of lung cancer and colorectal cancer [1]. Prostate-specific antigen (PSA) is the main test used in the detection of PCa, but its use remains controversial, because of the low specificity of this biomarker. Biopsy is negative in approximately 75% of patients with PSA between 4 and 10 µg/L; meanwhile, PCa is detected in 10–35% of patients with a negative first biopsy. Furthermore, the widespread use of PSA screening has led to earlier detection, but with a high rate of overdiagnosis, showing prolonged survival without reducing mortality significantly.

In the last years, several new biomarkers for aiding in the detection of PCa have emerged and have shown hopeful results. In this regard, *PCA3* assay appears to be promising. This biomarker was described in 1999 by Bussemakers et al. [2] as *DD3* gene, showing that this gene is highly overexpressed (about 70–100 fold) in prostate cancer cells with respect to normal prostate tissue. The most common transcript contains exons 1, 3, 4a and 4b [3]. However, exon 2 has been also

described as specifically amplified in PCa samples [4], but not in hypertrophic tissue. The *PCA3* score (the measurement of *PCA3* mRNA normalized by *PSA* mRNA) appears to be more useful in the detection of PCa than other biomarkers, including total PSA (tPSA) and free PSA (fPSA) [5–7]. Recently, Progenesa™ *PCA3* assay for the measurement of *PCA3* score in post digital rectal exam (DRE) first catch male urine specimens was approved by the FDA for use in conjunction with other patient information to aid in the decision for repeat biopsy in men 50 years or older and who have had one or more previous negative prostate biopsies. More controversial is the relationship between *PCA3* score and the aggressiveness of PCa, with contradictory results between authors [6,7], even when a recent study performed in a wide cohort of patients showed that *PCA3* score correlates with more aggressive cancer [8].

The aim of our study was to determine the value of *PCA3* score in the detection of PCa, estimating their assessment in the reduction of unnecessary biopsies. Also, we evaluated the relationship between this test and the aggressiveness of PCa.

2. Patients and methods

2.1. Patients

This retrospective study included 122 patients who underwent prostate biopsy because of PSA serum levels higher than 4.0 µg/L (93 with

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Molecular Genetics (CDB), Hospital Clínic, C/Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: +34 93 227 93 75; fax: +34 93 227 93 76.

positive and 29 with negative biopsy). Patients with other known tumors, medical therapy known to affect PSA serum levels, urinary infection or acute prostatitis were excluded from the study. Also, we measured *PCA3* score in 10 control subjects, with PSA <4.0 µg/L and negative DRE.

First catch urine samples were obtained from all participants after prostate massage, systematically applying severe pressure to the prostate from the base to the apex, and from the lateral to the median line of each lobe. Urine was obtained before prostate biopsy. Biopsies consisting of at least 10 cores were performed. Written informed consent was obtained from all participants. The protocol was approved by the Institutional Ethical Research Committee.

Total and free PSA serum levels were measured using the Elecsys total PSA and free PSA immunoassays (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), respectively. These are dual monoclonal antibody sandwich assays, calibrated against WHO standards. Total and free PSA testing was performed in an average of 4 months before or after urine specimen collection.

2.2. Urine sample preparation and procedure

Urine was caught in urine collection cups, containing 2 mL EDTA 0.5 M. Urine samples were kept at 4 °C and processed within 8 h after collection. The urine samples were centrifuged at 1000 ×g for 15 min at 4 °C, and then the cell pellets were re-suspended in 1 mL of TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and frozen at –80 °C until RNA extraction. RNAs from the urinary cell pellets were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and quantified with a NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

Single-stranded cDNA synthesis was carried out from 50 ng of total RNA using the MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, CA) and stored at –80 °C until preamplification with the TaqMan® PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) was performed.

A total of 6.25 µL of each cDNA sample, 12.5 µL of TaqMan® PreAmp Master Mix Kit 2 × (AB) and 6.25 µL of pooled assay mix 0.2 × containing three Gene Expression Assays (AB) were used for the multiplex pre-amplification of the target cDNAs following the manufacturer's instructions (AB). The three assays included in the pooled assay mix were TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA).

2.3. Quantitative PCR analysis

PCA3, the control transcript PSA (used as housekeeping gene) and $\beta 2$ microglobulin (used as a retrotranscription reaction control) (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems, Foster City, CA), were analyzed by quantitative real time PCR (qPCR). The *PCA3* probe (Hs01371939_g1, Applied Biosystems, Foster City, CA) spans the exons 2 and 3 and the exons 3 and 4. Reactions were carried out in triplicate on an ABI Prism-7300 qPCR machine (Applied Biosystems, Foster City, CA). Only results with a standard deviation (SD) value of <0.38 were accepted (as recommended by the manufacturer). Threshold levels were set into the exponential phase of the qPCR. Data analysis was carried out using the ABI Prism-7300 SDS Software-v1.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA) with the same baseline and threshold set for each plate to generate threshold cycle (Ct) values for all of the genes in each sample.

The coefficient of variation from the triplicates of the processed samples was from 0.13 to 7.22% for *PCA3*, and from 0.23 to 3.37% for PSA. In 6.5% of the samples, qPCR was repeated because SD of triplicates was higher than the recommended SD. The criteria evaluated indicate that the qPCR technique to measure the expression of *PCA3* gene fulfills the quality specifications necessary to accurately quantify the expression of this gene. The *PCA3* score was calculated as $1 / (ctPCA3/ctPSA)$.

2.4. Statistical analysis

t test and Mann–Whitney U test were used for comparisons of parametric and nonparametric continuous variables, respectively. Chi square was used to calculate differences between qualitative results. Patients were stratified according to the presence or absence of PCa at biopsy. Receiver operating characteristic (ROC) curves and the area under the curve (AUC) were used to evaluate the performance of *PCA3* score as a measure to discriminate between patients in the PCa group and the rest. The nonparametric method of DeLong was used to compare AUCs obtained in the ROC analysis [9].

The relationship between *PCA3* score and prostate volume, biopsy Gleason score, clinical stage, pathological Gleason score, and pathological stage was also assessed. Nonparametric Mann–Whitney U test or the Kruskal–Wallis test was used to assess significance levels.

Statistical analyses were performed using the statistical package SPSS v.15 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). All tests were 2-sided at the 0.05 level of significance. AUC comparisons were performed using the software Epidat 3.1 (Santiago de Compostela, Spain).

3. Results

Table 1 lists the characteristics of the 122 men evaluated in this study, including 61 patients at initial biopsy and 41 patients subjected to a repeat biopsy. Data concerning previous biopsies were not available in 20 patients. Among PCa patients, biopsy Gleason score was <7 in 46% (43/93) of patients and ≥ 7 in 54% (50/93) of patients. Data about pathologic Gleason score were available in 42 patients treated with radical prostatectomy (33% < 7; 67% ≥ 7). tPSA serum levels ranged from 4.16 to 17.76 µg/L for men with negative biopsy and from 4.07 to 20 µg/L in the PCa group. Means of tPSA serum levels were 7.19 ± 0.50 µg/L and 8.62 ± 0.41 µg/L, respectively. Significant differences were not appreciated between both groups of patients. %fPSA was available in 84 patients, showing significant differences ($p = 0.004$) between patients with negative biopsy (20.52 ± 1.55 ; $n = 26$) and patients with PCa (16.03 ± 1.27 ; $n = 67$).

We have also analyzed *PCA3* score in 10 control subjects, finding a median of 0.901 and a range from 0.807 to 0.957. 90% of these subjects had *PCA3* score levels lower than 0.90. Significant differences were appreciated between control subjects and patients with PCa ($p < 0.0001$), but not in relation to patients with negative biopsy.

Men with PCa (1.009 ± 0.010) had a *PCA3* score higher than patients with negative biopsy (0.912 ± 0.021 ; $p < 0.0001$). Additionally, we obtained a good correlation between *PCA3* score values and the probability of cancer that increased from 36.8% for patients with *PCA3* score ≤ 0.90 to 96.4% for patients with *PCA3* score > 1.04 (Fig. 1). The probability of cancer for patients with a *PCA3* score higher or equal to 0.95 was significantly higher than the probability of cancer for patients with a *PCA3* score lower than 0.95 ($p < 0.0001$).

Performance values for *PCA3* score, tPSA and %fPSA in terms of AUC are shown in Fig. 2. The area under the curve (AUC) was 0.804 for *PCA3* score, while AUCs for tPSA and %fPSA were 0.587 and 0.697, respectively. Significant differences were observed between AUCs for *PCA3* score and tPSA ($p = 0.0035$), but not between AUCs for *PCA3* score and %fPSA ($p = 0.162$). We did not find significant differences in the performance of *PCA3* score for patients at initial biopsy (AUC: 0.764; $n = 61$) or subjected to a repeat biopsy (AUC: 0.816; $n = 41$). The specificity of *PCA3* score at the cut-off of 0.90, corresponding to a sensitivity of 92.5%, was 41.4% (Table 2). In comparison, sensitivity and specificity for %fPSA at the cut-off of 25% were 81% and 26.9%, respectively. Using a cut-off of 0.90 for *PCA3* score, a reduction of 16% biopsies could be obtained, while 7 PCa would have been missed, including 2 patients with biopsy Gleason score 7 and 2 patients with biopsy Gleason score 9.

Table 3 shows results obtained for *PCA3* score in relation to tPSA serum levels. We did not find significant differences in *PCA3* score

Table 1
Characteristics of the study population.

	Negative biopsy Mean \pm std err (median)	Positive biopsy Mean \pm std err (median)	p value	All evaluable men Mean \pm std err (median)
n	29	93	–	122
Age	65.9 \pm 1.4 (67.5)	67.7 \pm 0.7 (68)	0.253	67.3 \pm 0.7 (68)
First biopsy	11	50	–	61
Repeated biopsy	18	23	–	41
No information available about previous biopsies	0	20	–	20
Biopsy Gleason score		93		93
<7	–	43	–	43
\geq 7	–	50	–	50
Pathological Gleason score		42		42
<7	–	14	–	14
\geq 7	–	28	–	28
Clinical stage		85		85
T1c	–	50	–	50
T2–T3	–	35	–	35
Pathological stage		42		42
T2a	–	6	–	6
T2b	–	3	–	3
T2c	–	28	–	28
T3a	–	5	–	5
Serum total PSA	7.19 \pm 0.50 (6.90)	8.62 \pm 0.41 (7.33)	0.158	8.28 \pm 0.34 (7.23)
4–10 μ g/L	26	67	–	93
10–20 μ g/L	3	26	–	29
Serum % free PSA (%)	20.52 \pm 1.55 (18.45)	16.03 \pm 1.27 (13.06)	0.004 ^a	17.42 \pm 1.02 (15.44)
<10	1	16	–	17
10–25	17	31	–	48
>25	8	11	–	19
Not available	3	35	–	38
PCA3 score	0.912 \pm 0.021 (0.918)	1.009 \pm 0.0104 (0.999)	<0.0001 ^a	0.986 \pm 0.010 (0.985)

^a Significant differences; age: t test; for the rest of parameters: Mann–Whitney U test.

between patients with tPSA from 4 to 10 μ g/L (0.978 \pm 0.012) and patients with tPSA from 10.1 to 20 μ g/L (1.009 \pm 0.018). Also, AUCs obtained for both groups of patients were similar (0.793 and 0.821, respectively). PCA3 score values in relation to biopsy Gleason score and to clinical stage are reported in Fig. 3. We did not find significant differences in PCA3 score between patients with biopsy Gleason score <7 (1.009 \pm 0.088; n = 42) and those with biopsy Gleason score \geq 7 (1.008 \pm 0.111; n = 50). Neither we did find significant differences in PCA3 score between patients with clinical stage T1c (1.002 \pm 0.085; n = 50) and patients with clinical stages T2 and T3 (1.026 \pm 0.125; n = 35). Radical prostatectomy was performed in 42 patients and no significant differences were found in PCA3 score between patients

with pathological Gleason score <7 (1.010 \pm 0.115; n = 14) and those with biopsy Gleason score \geq 7 (0.995 \pm 0.046; n = 28). No significant differences in PCA3 score were found between different pathological stages.

4. Discussion

New urinary biomarkers, among them PCA3, have been intensely studied over the past decade to improve the management of early PCa. Urine presents advantages over other fluids, as serum or plasma, because biomarkers produced by PCa cells go directly to urine, and they are diluted in a smaller volume. The measurement of biomarkers in urine, like PCA3, is particularly interesting when the specimen is obtained after a prostate massage in order to increase the quantity of prostatic material [10], being the informative rate of the sample near to 100% [11]. In this regard, according to Sokoll et al. [12] specimens obtained after prostate massage provided a high informative rate of 95.5%, whereas first morning void urine and specimens obtained before prostate massage provided markedly lower rates (80.4% and 74.4%, respectively).

In the present study, we investigated the ability of PCA3 score measured in urine samples obtained after prostate massage to predict the prostate biopsy outcome in a cohort of 122 patients with PSA between 4 and 20 μ g/L. We found that the probability of PCa was in relation to PCA3 score, with results ranging from 36.8% when PCA3 score was \leq 0.90 to 96.4% when PCA3 score was >1.04. The diagnostic performance of PCA3 score in our study was high, with an AUC of 0.804. The published AUC values for PCA3 are between 0.60 and 0.90 [6,7], with no differences between the FDA-approved Progenesa™ PCA3 and qRT-PCR manual assays [6].

Several studies have been published in the last years showing the clinical value of PCA3 to improve specificity over PSA and mostly also over %fPSA in the detection of PCa. Our study underlines that PCA3

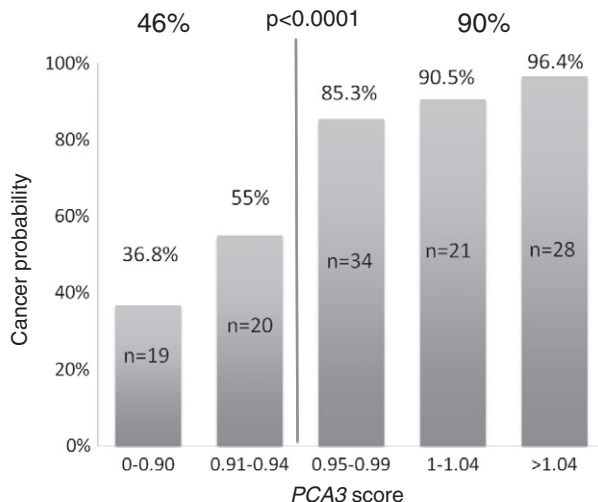


Fig. 1. Probability of prostate cancer in relation to PCA3 score.

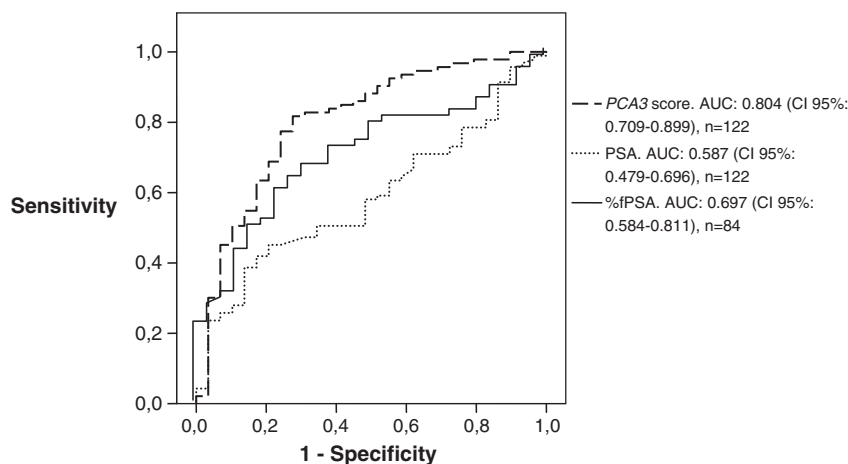


Fig. 2. Receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis for PCA3 score, PSA and %fPSA.

score performs better than PSA (AUC: 0.587) and %fPSA (AUC: 0.697), even though significant differences were found only between PCA3 score and tPSA. These results are in accordance with the majority of published series [13–17], but differ from results published by Auپرich et al. [18] who showed a better performance of %fPSA for patients with two or three previous negative biopsies.

In our experience, the performance of PCA3 score was independent from PSA serum levels, being that AUCs are very similar for patients with PSA between 4 and 10 $\mu\text{g/L}$ (0.793) and for patients with PSA between 10.1 and 20 $\mu\text{g/L}$ (0.821). On the other hand, we did not find significant differences for patients at initial biopsy (AUC: 0.764) or subjected to a repeat biopsy (AUC: 0.816). Both points agree with conclusions recently reported by Bradley et al. [19] in a comparative effectiveness review, analyzing 24 observational studies addressed to evaluate the diagnostic accuracy of PCA3 score.

Probably, one of the most controversial issues about PCA3 score concerns the definition of the cut-off used to detect PCa with an appropriate sensitivity and specificity. Using the commercial Progenesa™ PCA3 test, the most common score used is 35, even when FDA recommends the score of 25. Haese et al. [13], in a multicentre evaluation including 463 patients, indicated that a PCA3 score of 35 provided the optimal balance between sensitivity (47%) and specificity (72%), even when 27 (21%) cancers with a Gleason score of 7–9 would have been missed. The number of missed cancers may be reduced using lower cut-offs. Crawford

et al. [20], evaluating 1962 men with PSA higher than 2.5 $\mu\text{g/L}$ and/or abnormal DRE, showed a substantial reduction of missed cancers in relation to the cut-off used, decreasing from 21.6% when the score of 35 was considered to 5.6% when the score of 10 was considered. Similar findings have been recently reported by Capoluongo et al. [21], showing the best performance using the cut-off of 20, being the sensitivity 95.4% and the specificity 30.9%.

The main disadvantage of a manual assay for the measurement of PCA3 score is that the cut-off must be defined without any reference about the experience obtained using the commercial Progenesa™ PCA3 test. In this study we chose a cut-off of 0.90 in order to reduce at minimum the number of false negative results. Using this cut-off the sensitivity was 92.5% and the specificity was 41.4%. Similar results in specificity have been reported by other authors using cut-offs corresponding to a sensitivity of around 90% [20,23,24]. Using RT-qPCR manual assay, with a sensitivity of 90%, Rigau et al. [22] found a specificity of 25%, while Salami et al. [23], for a sensitivity of 93%, found a specificity of 37%. On the other hand, Crawford et al. [20] and Rubio-Briones et al. [25], using the Progenesa™ PCA3 test, reported specificities of 36.6% and 33% for sensitivities of 86.5% and 85%, respectively. Also, Chun et al. [24], using the Progenesa™ PCA3 test, found a specificity of 45% for a cut-off of 17, corresponding to a sensitivity of 81.3%.

The increasing use of PSA within the last 25 years has resulted in an overall down-staging of newly diagnosed PCa. Currently, a substantial proportion of new diagnosed patients has features of clinically insignificant prostate cancer and these patients can be candidates to active surveillance [26]. For this reason the availability of biomarkers of aggressiveness is relevant in PCa. Interestingly, Ferro et al. [27], evaluating the performance of the Progenesa™ PCA3 test in 300 patients, reported that patients with active surveillance compatible PCa had significantly lower PCA3 score values. However, the relationship between PCA3 score and tumor aggressiveness is a controversial point, with studies suggesting this relation [8,21, 28–30], and others concluding no relationship of PCA3 score with

Table 2
Sensitivity and specificity of the PCA3 assay and %fPSA.

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
PCA3 score cut-off 0.90	92.5	41.4	83.5	63.2
PCA3 score cut-off 0.95	76.3	74.2	91	50
PCA3 score cut-off 1.00	46.2	87.1	93.5	34.2
%fPSA cut-off 25%	81.0	26.9	71.2	38.9

Abbreviations: PSA, prostate-specific antigen; %fPSA, percent-free PSA.

Table 3
Mean and median PCA3 score and diagnostic accuracy of PCA3 score (cut-off 0.90) at different total PSA levels.

PCA3 score	Num of patients	AUC PCA3 score	Median	Mean \pm std err	p^a	Sensitivity (%)	Specificity (%)
All: tPSA 4–20 $\mu\text{g/L}$	122	0.804	0.985	0.986 \pm 0.010	–	92.5	41.4
tPSA 4–10 $\mu\text{g/L}$	93	0.793	0.970	0.978 \pm 0.012	0.093	92.5	42.3
tPSA 10.1–20 $\mu\text{g/L}$	29	0.821	0.999	1.009 \pm 0.018	–	92.3	33.3

^a Mann–Whitney U test.

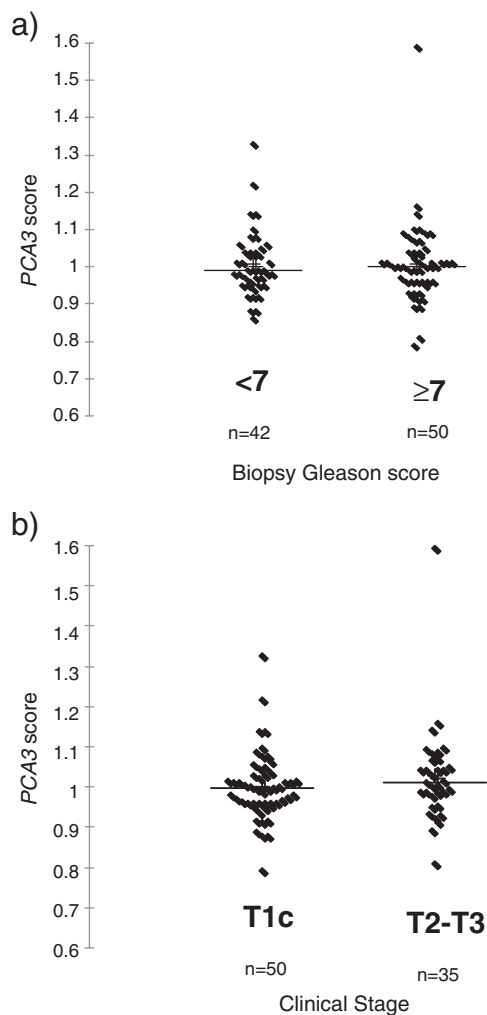


Fig. 3. PCA3 score in relation to biopsy Gleason score ($n = 92$) (a) and clinical stage ($n = 85$) (b).

Gleason score or with clinical and pathological stages [31–34]. No explanation has been proposed for this disagreement. Our results did not show evidence of a correlation of PCA3 score with Gleason score or with clinical and pathological stages.

The results presented in this evaluation are encouraging, but they have several limitations. It is important to note that our data, and the majority of previously reported studies about PCA3, are reported in patients selected by biopsy according to PSA serum levels. In this evaluation we studied patients with PSA between 4 and 20 $\mu\text{g/L}$. Differences in AUCs between PCA3 score and PSA would be lower if patients were selected minimizing the bias caused by the influence of PSA in their selection. On the other hand, even when initial results suggested that PCA3 is overexpressed in cancer tissue, false negative results were detected in our study, including among them two patients with biopsy Gleason score of 9.

Results presented in our study using a RT-qPCR assay are comparable to published results using the FDA-approved Progenesa™ PCA3. This RT-qPCR assay is an easy and cheap test with potential use in the detection of prostate cancer, showing an elevated probability of cancer in patients with high levels of PCA3 score. Multicentre evaluation of PCA3 measurement by Real-time PCR is necessary to validate its usefulness in clinical practice. In conclusion, PCA3 score could improve the prediction of PCa and help in selecting better men for biopsy.

Acknowledgments

This study was supported by grant Emili Letang from Hospital Clínic to Dr. Foj.

References

- [1] Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013; 49:1374–403.
- [2] Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 1999;59:5975–9.
- [3] Salagierski M, Schalken JA. Molecular diagnosis of prostate cancer: PCA3 and TMPRSS2:ERG gene fusion. *J Urol* 2012;187:795–801.
- [4] Clarke RA, Zhao Z, Guo AY, et al. New genomic structure for prostate cancer specific gene PCA3 within BMCC1: implications for prostate cancer detection and progression. *PLoS One* 2009;4:e4995.
- [5] Roobol MJ. Contemporary role of prostate cancer gene 3 in the management of prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2011;21:225–9.
- [6] Filella X, Foj L, Milà M, Augé JM, Molina R, Jiménez W. PCA3 in the detection and management of early prostate cancer. *Tumour Biol* 2013;34:1337–47.
- [7] Dijkstra S, Mulders PF, Schalken JA. Clinical use of novel urine and blood based prostate cancer biomarkers: a review. *Clin Biochem Oct 29 2013* [pii: S0009-9120(13)00497-9].
- [8] Chevli KK, Duff M, Walter P, et al. Urinary PCA3 as a predictor for prostate cancer in a cohort of 3073 men undergoing initial prostate biopsy. *J Urol Dec 10 2013* [pii: S0022-5347(13)06087-4].
- [9] DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988;44:837–45.
- [10] Truong M, Yang B, Jarrard DF. Toward the detection of prostate cancer in urine: a critical analysis. *J Urol* 2013;189:422–9.
- [11] Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, et al. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem* 2006; 52:1089–95.
- [12] Sokoll LJ, Ellis W, Lange P, et al. A multicenter evaluation of the PCA3 molecular urine test: pre-analytical effects, analytical performance, and diagnostic accuracy. *Clin Chim Acta* 2008;389:1–6.
- [13] Haese A, de la Taille A, van Poppel H, et al. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur Urol* 2008;54:1081–8.
- [14] de la Taille A, Irani J, Graefen M, et al. Clinical evaluation of the PCA3 assay in guiding initial biopsy decisions. *J Urol* 2011;185:2119–25.
- [15] Perdonà S, Bruzzese D, Ferro M, et al. Prostate health index (phi) and prostate cancer antigen 3 (PCA3) significantly improve diagnostic accuracy in patients undergoing prostate biopsy. *Prostate* 2013;73:227–35.
- [16] Ferro M, Bruzzese D, Perdonà S, et al. Predicting prostate biopsy outcome: prostate health index (phi) and prostate cancer antigen 3 (PCA3) are useful biomarkers. *Clin Chim Acta* 2012;413:1274–8.
- [17] Stephan C, Jung K, Semjonow A, et al. Comparative assessment of urinary prostate cancer antigen 3 and TMPRSS2:ERG gene fusion with the serum [–2] proprostate-specific antigen-based prostate health index for detection of prostate cancer. *Clin Chem* 2013;59:280–8.
- [18] Auprich M, Augustin H, Budäus L, et al. A comparative performance analysis of total prostate-specific antigen, percentage free prostate-specific antigen, prostate-specific antigen velocity and urinary prostate cancer gene 3 in the first, second and third repeat prostate biopsy. *BJU Int* 2012;109:1627–35.
- [19] Bradley LA, Palomaki GE, Gutman S, Samson D, Aronson N. Comparative effectiveness review: prostate cancer antigen 3 testing for the diagnosis and management of prostate cancer. *J Urol* 2013;190:389–98.
- [20] Crawford ED, Rove KO, Trabulsi EJ, et al. Diagnostic performance of PCA3 to detect prostate cancer in men with increased prostate specific antigen: a prospective study of 1,962 cases. *J Urol* 2012;188:1726–31.
- [21] Capoluongo E, Zambon CF, Basso D, et al. PCA3 score of 20 could improve prostate cancer detection: results obtained on 734 Italian individuals. *Clin Chim Acta* 2013;429C:46–50.
- [22] Rigau M, Morote J, Mir MC, et al. PSGR and PCA3 as biomarkers for the detection of prostate cancer in urine. *Prostate* 2010;70:1760–7.
- [23] Salami SS, Schmidt F, Laxman B, et al. Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. *Urol Oncol* 2013;31:566–71.
- [24] Chun FK, de la Taille A, van Poppel H, et al. Prostate cancer gene 3 (PCA3): development and internal validation of a novel biopsy nomogram. *Eur Urol* 2009; 56:659–67.
- [25] Rubio-Briones J, Fernández-Serra A, Ramírez M, et al. Outcomes of expanded use of PCA3 testing in a Spanish population with clinical suspicion of prostate cancer. *Actas Urol Esp* 2011;35:589–96.
- [26] Klotz L. Active surveillance for prostate cancer: overview and update. *Curr Treat Options Oncol* 2013;14:97–108.
- [27] Ferro M, Bruzzese D, Perdonà S, et al. Prostate Health Index (Phi) and prostate cancer antigen 3 (PCA3) significantly improve prostate cancer detection at initial biopsy in a total PSA range of 2–10 ng/ml. *PLoS One* 2013;8:e67687.
- [28] Nakanishi H, Groskopf J, Fritsche HA, et al. PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: implication in selecting candidates for active surveillance. *J Urol* 2008;179:1804–9.

- [29] van Poppel H, Haese A, Graefen M, et al. The relationship between prostate cancer gene 3 (PCA3) and prostate cancer significance. *BJU Int* 2012;109:360–6.
- [30] Durand X, Xylinas E, Radulescu C, et al. The value of urinary prostate cancer gene 3 (PCA3) scores in predicting pathological features at radical prostatectomy. *BJU Int* 2012;110:43–9.
- [31] Augustin H, Mayrhofer K, Pummer K, Mannweiler S. Relationship between prostate cancer gene 3 (PCA3) and characteristics of tumor aggressiveness. *Prostate* 2013;73:203–10.
- [32] Hessels D, van Gils MP, van Hooij O, et al. Predictive value of PCA3 in urinary sediments in determining clinico-pathological characteristics of prostate cancer. *Prostate* 2010;70:10–6.
- [33] Ploussard G, Durand X, Xylinas E, et al. Prostate cancer antigen 3 score accurately predicts tumour volume and might help in selecting prostate cancer patients for active surveillance. *Eur Urol* 2011;59:422–9.
- [34] van Gils MP, Hessels D, Hulsbergen-van de Kaa CA, et al. Detailed analysis of histopathological parameters in radical prostatectomy specimens and PCA3 urine test results. *Prostate* 2008;68:1215–22.

Exosomal and Non-Exosomal Urinary miRNAs in Prostate Cancer Detection and Prognosis

Laura Foj,¹ Ferran Ferrer,² Marta Serra,³ Antonio Arévalo,³ Montserrat Gavagnach,³
Nuria Giménez,⁴ and Xavier Filella^{1*}

¹Department of Biochemistry and Molecular Genetics (CDB), Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Catalonia, Spain

²Department of Radiotherapy, Institut Català d'Oncologia, IDIBELL, Department of Clinical Sciences-Bellvitge Health Sciences Campus, University of Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain

³CAP Valldoreix, Sant Cugat del Vallès, Catalonia, Spain

⁴Research Unit, Fundació de Recerca Mútua Terrassa, Terrassa, Catalonia, Spain

BACKGROUND. MicroRNAs (miRNAs) are non-coding small RNAs, involved in post-transcriptional regulation of many target genes.

METHODS. Five miRNAs that have been consistently found deregulated in PCa (miR-21, miR-141, miR-214, miR-375, and let-7c) were analyzed in urinary pellets from 60 prostate cancer (PCa) patients and 10 healthy subjects by qRT-PCR. Besides, urinary exosomes were isolated by differential centrifugation and analyzed for those miRNAs.

RESULTS. Significant upregulation of miR-21, miR-141, and miR-375 was found comparing PCa patients with healthy subjects in urinary pellets, while miR-214 was found significantly downregulated. Regarding urinary exosomes, miR-21 and miR-375 were also significantly upregulated in PCa but no differences were found for miR-141. Significant differences were found for let-7c in PCa in urinary exosomes while no differences were observed in urinary pellets. A panel combining miR-21 and miR-375 is suggested as the best combination to distinguish PCa patients and healthy subjects, with an AUC of 0.872. Furthermore, the association of miRNAs with clinicopathological characteristics was investigated. MiR-141 resulted significantly correlated with Gleason score in urinary pellets and let-7c with clinical stage in urinary exosomes. Additionally, miR-21, miR-141, and miR-214 were found significantly deregulated in intermediate/high-risk PCa versus low-risk/healthy subjects in urinary pellets. Significant differences between both groups were found in urinary exosomes for miR-21, miR-375, and let-7c.

CONCLUSIONS. These findings suggest that the analysis of miRNAs—especially miRNA-21 and miR-375- in urine could be useful as biomarkers in PCa. *Prostate*

© 2016 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: prostate cancer; miRNA; exosomes; urine

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is currently the second most common frequently diagnosed cancer and the fifth leading cause of cancer-related death among males worldwide [1]. Prostate-specific antigen (PSA) has been extensively used in the early detection of PCa despite the problems related to its low specificity. On the other hand, PSA screening results in overdiagnosis and overtreatment of insignificant PCa. Consequently, it is an imperative to identify new accurate biomarkers that

Conflicts of interest: None.

*Correspondence to: Xavier Filella, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic, IDIBAPS, C/Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Catalonia, Spain. E-mail: xfilella@clinic.cat
Received 20 September 2016; Accepted 5 December 2016
DOI 10.1002/pros.23295

Published online in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).

allow the detection of PCa at an early stage and can distinguish aggressive from insignificant tumors.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that modulate the expression of specific genes at post-transcriptional level and have emerged as novel promising biomarkers for PCa detection and prognosis. MiRNAs have been found involved in multiple biological processes and therefore in a variety of oncogenic pathways [2,3]. MiRNAs can either function as oncogenes or tumor-suppressors depending on their target genes [4].

Several profiling studies have already shown that the expression of miRNAs is commonly altered in PCa compared with normal tissues [5,6]. Numerous studies have demonstrated that miR-21, miR-141, and miR-375 were the most repeated significantly deregulated miRNAs in PCa in tissue as well as in blood [7,8]. On the other hand, let-7c and miR-214 were also found deregulated in PCa, playing an outstanding role in tumor progression and metastasis [9,10].

Urine appears as a challenging alternative to plasma/serum for PCa biomarker discovery. In the last years, several authors have defined miRNA profiles of PCa in urine [11–13] but no overlapping expression pattern exists between the different publications. Consequently, there is not at the moment any miRNA urine test for the early detection and prognosis of PCa. More studies in urine are necessary to validate those miRNAs that have been found repeatedly deregulated in tissue.

Moreover, exosomes emerge as a new source of cancer biomarkers [14]. They are small (30–150 nm) vesicles released by most cell types that contain proteins, lipids, and nucleic acids (e.g., miRNAs) that serve a variety of functions including intercellular communication [15]. The study of new biomarkers in exosomes is a promising field because they are remarkably stable in body fluids and their content is protected from enzymatic degradation by the exosomal lipid bilayer [16]. The presence of exosomes in urine was first reported in 2004 [17], and since then they have been shown to be of interest in several diseases [18] including PCa [19].

The goal of this work, was to study the potential of five cancer-associated miRNAs, miR-21, miR-141, miR-214, miR-375, and let-7c in urinary pellets and exosomes as biomarkers for PCa detection and prognosis.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Clinical Samples

We collected freshly voided urine samples from 60 patients with PCa. Demographic data and medical

history were obtained at the entry of each patient to the study. Digital rectal examination (DRE) was performed in all patients in order to determine the clinical stage. Patients with other malignancies than non-melanoma skin cancer and patients who had undergone any previous treatment related to PCa or benign prostatic hyperplasia (BPH) with 5-alpha-reductase inhibitors were excluded from the study. A group of 10 healthy volunteers was also included. PSA serum levels were lower than 4 µg/L (mean: 1.14 µg/L; standard deviation: 0.95) and DRE was negative in all healthy subjects.

The study was approved by ethical committees of involved medical centres, and written informed consent was obtained from all study participants.

Urinary Pellets Preparation

Urine samples (30–50 ml) were collected in containers without any preservative after a prostate massage. Samples were stored at 4°C and centrifuged within 4 hr after collection (2,000 g for 20 min at 4°C). The pellet was then washed with 2 ml of an ice-cold phosphate buffered saline solution (PBS) and again centrifuged (2,000g for 5 min at 4°C). Afterwards, 1 ml QIAzol (Qiagen[®], Hilden, Germany) was added to the pellet, mixed, and left at room temperature for 5 min. The pellet with QIAzol was stored at –80°C until analysis. Sera from all participants were also obtained before prostate massage for the PSA measurement.

Urinary Exosomes Isolation

Exosomes were isolated by differential centrifugation from urine of 10 healthy subjects and 52 of the 60 PCa patients included in the study. After obtaining the urinary pellet, the supernatant was transferred to ultracentrifuge tubs (polycarbonate) and centrifuged at 17,000 g for 45 min at 4°C. Then the supernatant was transferred to another tub and again centrifuged at 2,00,000 g for 2 hr at 4°C. Afterwards, the supernatant was discarded. The pellet was recovered, reconstituted with PBS and stored at –80°C until the RNA isolation. The presence of exosomes in the pelleted sample was confirmed by electronic microscopy (Fig. 1).

Electronic Microscopy

For transmission electron microscopy, an aliquot of the pelleted exosomes was fixed in 3% paraformaldehyde. A drop of the sample was placed in a formvar coated grid for 10 min and after extracting the excess of fluid, it was stained with 2% uranyl acetate for 3 min. After that, a MilliQ water drop was added for

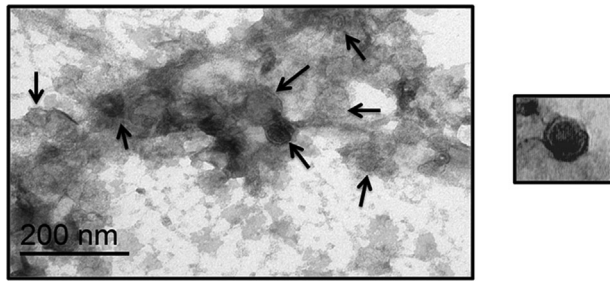


Fig. 1. Electron micrograph of urinary exosomes isolated by differential centrifugation. A drop of the pelleted exosomes fixed in 3% paraformaldehyde was placed in a formvar coated grid and stained with uranyl acetate. The sections were examined in a Jeol 1010 transmission electron microscope. At the right photo, the double membrane of exosome is appreciated with more detail. Scale bar = 200 nm.

3 min, then the excess of fluid was extracted and the sample was dried. Finally, the samples were examined in a Jeol 1010 transmission electron microscope at 80 kV supplied with CCD Gatan ORIUS camera.

Isolation of miRNAs from Urinary Pellets and Exosomes

Total RNA was isolated from frozen pellets and exosomes using miRNeasy serum/plasma kit (Qiagen[®]) according to the manufacturer's instructions. Previously to the addition of the chloroform, the spike-in control cel-miR-39 was incorporated. The concentration of RNA was quantified using NanoDrop ND-1,000 Spectrophotometer (Thermo Scientific[®], Waltham, MA). RNA was kept at -80°C till its use in the reverse transcription polymerase chain reaction.

Reverse Transcription and Preamplication PCR

RNA was converted to cDNA using TaqMan[®] miRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems[®], Foster City, CA). Non reverse transcriptase controls were used to rule out the possibility of potential genomic DNA contamination. After reverse transcriptase PCR, a preamplication step using TaqMan[®] Preamp Mastermix (Applied Biosystems[®]) was performed in order to increase the amount of cDNA and to improve the sensitivity of the qRT-PCR.

Measurement of miRNA Expression With Quantitative Real Time PCR Reaction (qRT-PCR)

The expression of five mature miRNAs namely hsa-miR-21, hsa-miR-141, hsa-miR-214, hsa-miR-375, and hsa-let-7c (Table I) was quantified using TaqMan[®] single microRNA assays (Applied Biosystems[®]) in

TABLE I. Sequences of Taqman[®] miRNAs Assays Chosen for Evaluation in the Present Study

miRBase ID	Sequence
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
hsa-miR-141-3p	UAACACUGUCUGUAAAGAUGG
hsa-miR-214-3p	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU
hsa-miR-375	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA
hsa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
cel-miR-39-3p	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG

accordance with the manufacturer's protocol and the MIQE guidelines. Quantitative real time PCR (qRT-PCR) was carried out by Applied Biosystems[®] 7,300 system with the following cycling parameters: 95°C for 10 min, then 40 cycles of 95°C for 15 sec, followed by 60°C for 60 sec.

Relative miRNA expression levels were normalized against the spike-in control cel-miR-39. Relative gene expression was calculated using the $-2\Delta\Delta\text{Ct}$ method [20] with normalization to RNA input.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with SPSS Statistics version 23 (IBM, Somers, NY). MiRNA expression data were assessed for the distribution of normality using Kolmogorov-Smirnov test. Mann-Whitney U or Kruskal-Wallis tests were used to identify significantly ($P < 0.05$) deregulated miRNAs and to compare miRNA expression levels in relation to clinicopathological characteristics. Receiver operating curve (ROC) analysis was used to calculate the area under the curve (AUC) of miRNAs expression levels. Models including several miRNAs were constructed by binary logistic regression analysis. AUCs for these models were calculated using ROC analysis.

RESULTS

Patients' Characteristics

Demographic and clinical data are summarized in Table II, including information regarding PSA serum levels, biopsy Gleason score, and clinical stage. PCa patients were classified according to the D'Amico criteria, including four patients with low-risk (clinical stage T1-T2a, Gleason score <7 , and PSA $\leq 10 \mu\text{g/L}$), 19 patients with intermediate risk (clinical stage T2b or Gleason score =7 or PSA $10-20 \mu\text{g/L}$) and 37 patients with high-risk (clinical stage T2c or PSA $>20 \mu\text{g/L}$ or Gleason score >7). Urinary exosomes were obtained in 52 of these patients (Table II).

TABLE II. Demographic and Clinicopathological Characteristics of the Patients Included in the Study

Number of patients	60 (52)
Age (years)	
Median	71 (71)
Range	60–83 (60–83)
PSA serum levels ($\mu\text{g/L}$)	
Median	7.7 (8.3)
Range	2.21–47 (4.18–47)
Biopsy Gleason score	
<7	14 (11)
7	34 (29)
>7	12 (12)
Clinical stage	
T1c	16 (16)
T2-T3	44 (36)
D'Amico risk groups	
Low-risk	4 (3)
Intermediate risk	19 (16)
High-risk	37 (33)

PCa, prostate cancer; PSA, prostate-specific antigen. In brackets are shown the data of patients in which urinary exosomes were also analyzed.

Comparison of miRNA Levels in Urinary Pellet Between PCa Patients and Healthy Subjects

We found that miR-21, miR-141, and miR-375 were upregulated in the urinary pellet of PCa patients in comparison with healthy subjects (P of 0.001, 0.033, and 0.038, respectively), whereas miR-214 was significantly downregulated in PCa patients ($P = 0.049$). The expression levels of let-7c showed no significant differences between both groups (Fig. 2A).

We further analyzed miRNAs by the receiver-operating characteristic curve, showing 95% confidence intervals. The AUC of urinary miR-21, miR-141, miR-214, miR-375, and let-7c were 0.817, 0.712, 0.716, 0.707, and 0.636, respectively (Fig. 3 A). In a multivariate study based on binary logistic regression, we showed that the higher AUC was obtained combining miR-21 and miR-375 (0.872).

Comparison of miRNA Levels in Urinary Exosomes Between PCa Patients and Healthy Subjects

The five miRNAs were also analyzed by qRT-PCR on the urinary exosomes. We found that miR-21, miR-375, and let-7c were significantly upregulated (P of 0.018, 0.001, and 0.048, respectively) in the PCa group compared with the healthy group (Fig. 2B). No significant differences for the other studied miRNAs were found comparing both groups, although miR-141 showed a trend to upregulation ($P = 0.091$).

The AUC of miR-21, miR-141, miR-214, miR-375, and let-7c in urinary exosomes were 0.713, 0.652, 0.542, 0.799, and 0.679, respectively (Fig. 3B). No improvement was found combining these miRNAs in a multivariate study based on binary logistic regression.

Association of Urinary miRNA Expression With Clinicopathological Factors

The expression value of each miRNA in tumors was tested in both urinary pellets and exosomes for association with clinicopathological parameters.

Urinary pellets. miR-141 was significantly ($P = 0.034$) differently expressed in relation to Gleason score, showing higher levels in patients with higher Gleason score (Fig. 4). No significant differences between Gleason score groups were found for miR-21, miR-214, miR-375, and let-7c. On the other hand, no significant differences were found for any miRNA comparing T1c versus T2/ T3 patients. MiRNAs levels in patients classified according to the D'Amico criteria are shown in Figure 5A. Significant differences were found comparing results in healthy subjects and low-risk PCa group versus intermediate and high-risk PCa groups for miR-21 ($P < 0.0001$), miR-141 ($P = 0.016$), and miR-214 ($P = 0.024$). No significant differences were found for miR-375 ($P = 0.098$) and let-7c ($P = 0.214$).

Urinary exosomes. No significant differences between Gleason score groups were found for any of the analyzed miRNA. On the other hand, let-7c levels were significantly associated with clinical stage ($P = 0.023$) comparing T1c versus T2/T3 patients (Fig. 6). No significant differences were found for the rest of the analyzed miRNAs. MiRNAs levels in patients classified according to the D'Amico criteria are shown in Figure 5B. Significant differences were found comparing results in healthy subjects and low-risk PCa group versus intermediate and high-risk PCa groups for miR-21 ($P = 0.003$), miR-375 ($P = 0.001$), and let-7c ($P = 0.048$). No significant differences were found for miR-141 ($P = 0.055$) and miR-214 ($P = 0.833$).

DISCUSSION

Previous findings have shown that the different expression patterns of miRNAs in tissues can be used to distinguish PCa from normal tissue [6,9]. Also, the diagnostic and prognostic value of circulating miRNAs has been suggested by several authors [11,13]. Urine appears as a challenging alternative to plasma/serum

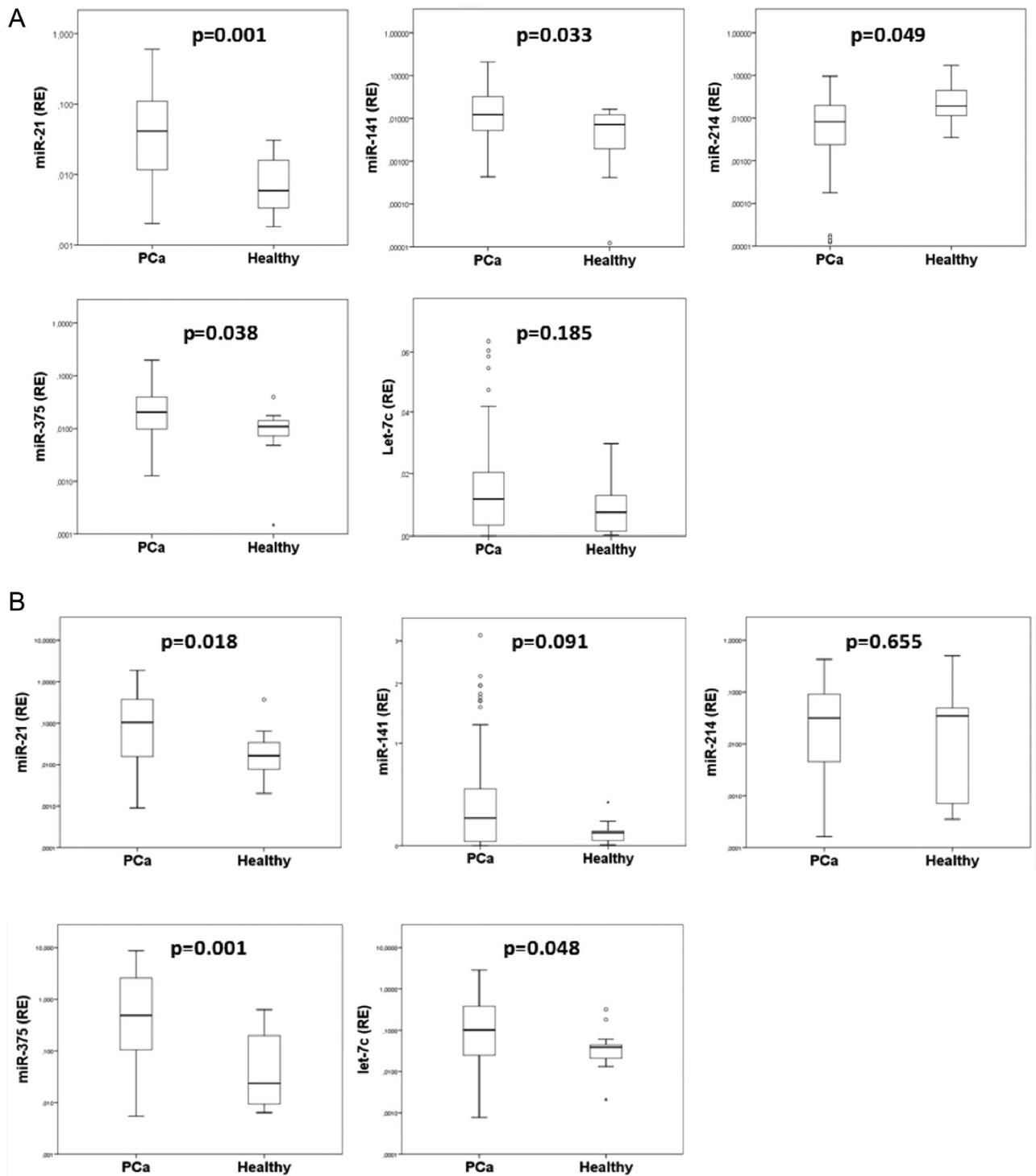


Fig. 2. Boxplots of the five microRNAs relative expression comparing PCa patients and healthy subjects groups in urinary pellets (A) and in urinary exosomes (B). Statistical test: U Mann–Whitney. RE, relative expression; PCa, prostate cancer.

for PCa biomarker discovery. Urine contains exfoliated PCa cells and other secreted products, especially when prostate massage is performed. Besides, the protein content is lower in urine than in serum and plasma, reducing thus interferences in the RNA-derived biomarkers isolation [21].

In the present study, the levels of five miRNA in urinary pellets from 60 PCa patients and 10 healthy controls were analyzed. Furthermore, these miRNAs were studied in urinary exosomes from 52 patients of those PCa patients and from all healthy subjects. We found that miR-21, miR-141, and miR-375 were

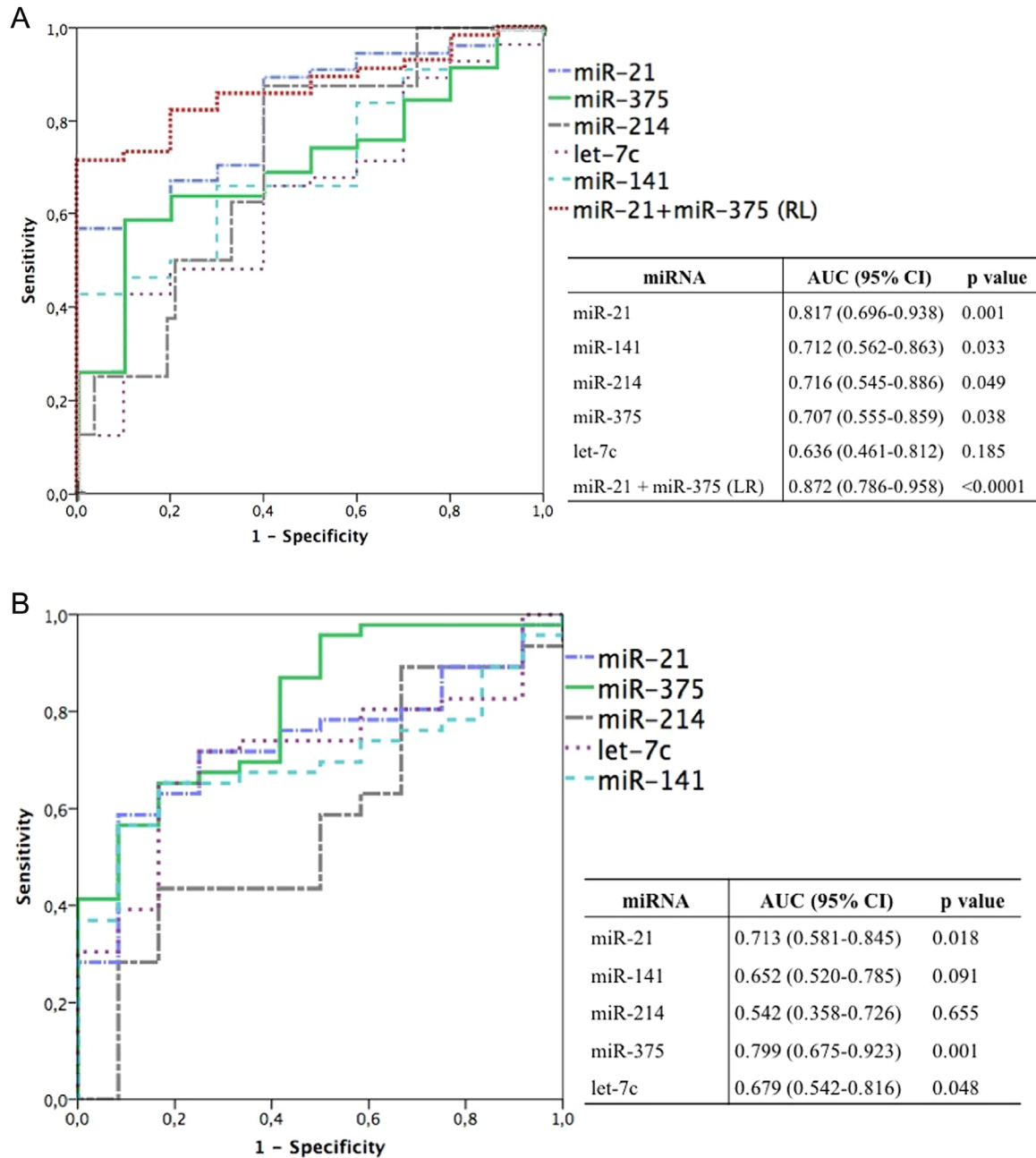


Fig. 3. Receiver-operating characteristic curve analysis and area under the curve with 95% confidence interval of miRNAs analyzed in urinary pellets (**A**) and in urinary exosomes (**B**). AUC, area under the curve; CI, confidence interval; LR, logistic regression analysis.

significantly upregulated in pellets of PCa patients, while miR-214 was significantly downregulated. A panel combining miR-21 and miR-375 is suggested as the best combination to distinguish PCa patients and healthy subjects, showing an AUC of 0.872. When we studied the expression of the same miRNAs in the urinary exosomes, we confirmed that the levels of miR-21 and miR-375 were also significantly increased in PCa patients. No significant differences were found for miR-141 and miR-214 in exosomes comparing both groups, although there was a trend to

upregulation for miR-141. Let-7c was significantly upregulated in exosomes, but not in urinary pellet.

Urinary miRNAs showing diagnostic potential for PCa identification have been reported in several previous studies analysing different urine fractions [7,8]. Our data are in concordance with results recently published by Stuopelytė et al. [22], showing that miR-21 levels were higher in urinary pellets of PCa than in BPH patients. We also agree with Srivastava et al. [12] who found that miR-214 was downregulated in total urine samples of PCa

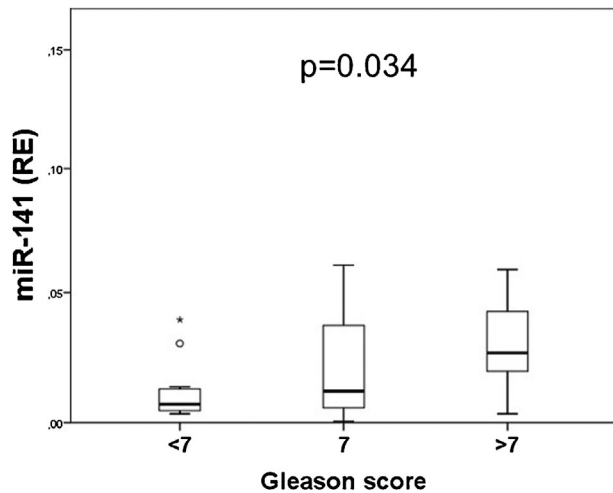


Fig. 4. Boxplots of miR-141 comparing the different Gleason score groups in urinary pellets. Statistical test: Kruskal–Wallis. RE, relative expression.

patients compared with healthy donors. According to Ahumada-Tamayo et al. [23], let-7c was upregulated in urinary pellets of PCa versus BPH patients, while we only found significant differences for let-7c in urinary exosomes. Finally, contrarily to our results, Bryant et al. [24] did not find significant differences for miR-375 and miR-141 in urinary pellets comparing PCa patients and benign controls. Differences in methodology could explain contradictory results between studies [25].

Faithfully, few authors have studied miRNAs in urinary exosomes in PCa patients until the moment. Bryzgunova et al. [19] have recently demonstrated promising results in the detection of PCa analysing miR-19b in urinary exosomes isolated by differential centrifugation. On the other hand, Samsonov et al. [26] showed that miR-21, miR-141, and miR-574 were upregulated in PCa patients compared with healthy controls in urinary exosomes isolated by a lectin-based exosomes agglutination method. However, in this study, only miR-141 was found significantly upregulated when urinary exosomes were isolated by differential centrifugation. Our results suggest the value of urinary exosomes in PCa detection, although the AUCs were in general lower than those obtained in urinary pellet. Our results confirm the aforementioned data about miR-21 and underline the value of miR-21 and miR-375, with AUCs of 0.713 and 0.799, respectively. Methodological differences in the isolation of exosomes could explain discordant results in relation to previous published data concerning miR-141.

Furthermore, miRNAs analyzed in this study have been already found significantly deregulated in PCa patients when they were evaluated in serum/plasma or in circulating exosomes. For instance, Cheng

et al. [27] observed the significant upregulation of circulating miR-141 and miR-375 with AUCs of 0.842 and 0.660, respectively, comparing metastatic castration resistant PCa patients with healthy controls. Similarly, Mitchell et al. [11] found significant upregulation of miR-141 in serum of metastatic PCa patients compared with healthy donors, with an AUC of 0.907. Yaman Agaoglu et al. [28] obtained an AUC of 0.88 for miR-21, showing higher levels in plasma of PCa patients versus healthy controls. Selth et al. [29] also found higher levels of miR-141 and miR-375 in plasma of metastatic castration PCa patients compared with healthy individuals. Li et al. [30] studied miRNAs in serum exosomes of PCa patients and healthy controls and found that miR-375 and miR-21 were upregulated in PCa.

PCa is a very heterogeneous disease, including patients with low-risk of progression, in which cancer-specific survival rates exceeded 99% at 15-year follow-up. Specific gene-expression patterns have been identified for low-risk PCa. Recently, Rubin et al. [31] have reported specific genomic profiles related to Gleason score, showing fewer driver mutations and no polyploidy when Gleason score is lower than 7. Moreover, several authors argued that the label of cancer must be put into question for patients with Gleason score 6 or lower [32,33]. In fact, active surveillance, differing treatment in case of cancer progression, has been proposed for patients with low-risk of progression as an alternative to radical treatment.

Published data concerning the value of miRNAs to predict the aggressiveness of PCa are contradictory. According to Stephan et al. [34] miR-183 and miR-205 were not associated with Gleason score and serum PSA. Sapre et al. [35] showed that several miRNAs, including miR-21 and miR-375, were upregulated in patients with high-risk PCa. The authors selected a miRNAs signature combining miR-16, miR-21, and miR-222 to predict high-risk PCa. However, results were not confirmed when this signature was validated in an independent cohort of patients. On the other hand, Lewis et al. [36] found significant differences comparing patients with Gleason score higher than 8 versus patients with lower scores for miR-888, miR-34a, miR-205, let-7c, let-7d, miR-200b, miR-92a, miR-99a, miR-141, and miR-375. In our study a significant association of miR-141 expression in urinary pellet with Gleason score was shown, while let-7c in urinary exosomes was significantly lower in patients with T2-3 clinical stage. However, no significant differences were found for other miRNAs.

The D'Amico risk group classification, combining Gleason score, PSA serum levels, and clinical stage, was proposed to estimate the risk of biochemical recurrence for localized PCa [37]. It has been shown

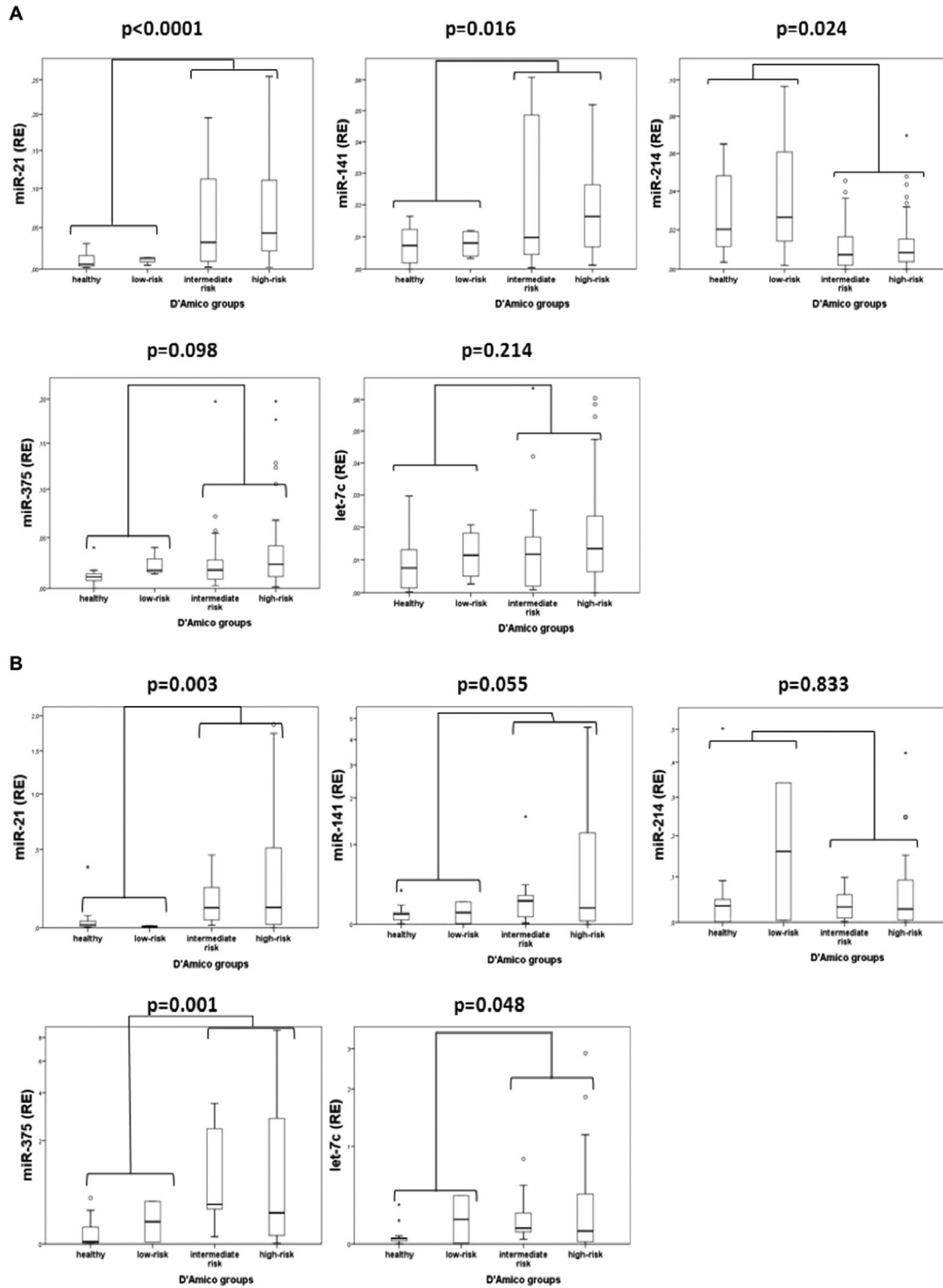


Fig. 5. Boxplots of the five microRNAs relative expression comparing the different D'Amico prostate cancer risk groups and healthy subjects in urinary pellets (**A**) and in urinary exosomes (**B**). Statistical test: U Mann–Whitney. RE, relative expression.

that the prognosis for patients in the low-risk group is optimal. For this group of patients, the cancer-specific survival was 99.7% and local recurrence-free survival was 97% at 10 years, according to a Mayo Clinic validation of the D'Amico risk group classification [38].

In our study, we studied the association between the expression of miRNAs and the D'Amico risk groups, comparing patients with intermediate and high-risk against low-risk patients together with healthy subjects. We found that miR-21, miR-141, and miR-214 in

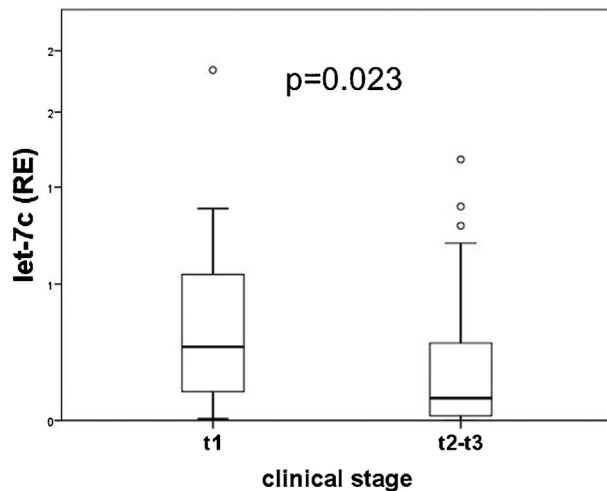


Fig. 6. Boxplots of let-7c comparing the different clinical stage groups in urinary exosomes. Statistical test: U Mann–Whitney. RE, relative expression.

urinary pellet showed significant differences between both groups, while a certain trend existed for miR-375 ($P=0.098$). In urinary exosomes, we observed that miR-21 and miR-375 levels were higher in intermediate/high-risk PCa group and that the same trend was observed for miR-141 ($P=0.055$). Finally, we encountered an irregular pattern for let-7c levels, showing higher levels in low-risk PCa than in the other groups.

Our preliminary results suggest that urinary miRNAs could distinguish aggressive PCa. Likewise, Huang et al. [39] showed that higher levels of miR-375 and miR-1290 in exosomes isolated from plasma were significantly associated with poor overall survival in metastatic castration resistant PCa patients. Notably, Wang et al. [40] proposed a miRNAs signature combining miR-19, miR-345, and miR-519c-5p in serum to predict adverse pathology in PCa patients eligible for active surveillance. Additional studies are necessary to demonstrate the value of miRNAs to predict PCa aggressiveness.

According to our data, miR-21 and miR-375 have diagnostic and prognostic value, suggesting their usefulness in PCa management. MiR-21 is usually upregulated in early PCa as well as in metastatic cancer [41,42], playing a crucial role in prostate carcinogenesis. It contributes to tumor growth, invasiveness, androgen insensitivity and metastasis through various pathways [42–44]. MiR-21 directly downregulates *PTEN*, reducing apoptosis significantly and promoting angiogenesis through HIF-1 α signaling pathway [45,46]. It also regulates *MARCKS*, conferring apoptosis resistance [47]. Furthermore, the upregulation of miR-21 in PCa also plays an important role in epithelial-mesenchymal transition (EMT)

by decreasing the *BTG2* levels and promoting the acquisition of luminal markers [44,48]. Besides, it has been shown that miR-21 and androgen receptor (AR) gene regulate each other in a positive feedback loop. Ribas et al. [49] reported that AR act as a direct transcriptional regulator and binds to a defined miR-21 promoter, miPPR-21, resulting in overexpression of miR-21, which enhances androgen-dependent PCa growth. Moreover, the abnormal expression of miR-375 in PCa has been involved in enhanced migration and invasion of the tumor. Recently, Pickl et al. [50] identified the Polycomb repressive complex I member *CBX7* as a major target of miR-375 in PCa progression. The repression of *CBX7* by miR-375 leads to the activation of transcriptional programs related to malignant progression. Additionally, miR-375 also plays a role in mesenchymal–epithelial transition (MET), through a ZEB1–miR-375–YAP1 network, favouring the invasion and metastatic disease [51]. The involvement of miR-21 and miR-375 in key signaling pathways remarks their usefulness as PCa biomarkers. According to our results, both biomarkers are upregulated in intermediate and high-risk PCa patients, suggesting their participation in PCa progression.

The small sample size of the control group and the low-risk PCa group constitutes a limitation of this study. A larger study would be necessary to confirm the prognostic and diagnostic value of miR-21 and miR-375. Furthermore, our conclusions are limited because biopsy was not performed in the healthy control group. Additional studies including patients with negative biopsy and BPH patients would be necessary to support our data. Because of RNA in urine is scarce, a prostate massage previous to collect the urine was performed in our study. Further studies would be necessary to check if similar miRNAs results could be obtained collecting urine without a previous prostate massage.

CONCLUSIONS

Several challenges should be investigated before the use of miRNAs as PCa biomarkers in clinical practice. Contradictory results between studies can be caused by differences in the methodology used to analyze miRNAs or for the exosomes isolation as well as by the different urine fraction studied by each group. Optimization and standardization of the methodology used for miRNAs analysis is a previous requirement to obtain high quality results. Besides, more effective methods for isolation of exosomes in body fluids are required. Nevertheless, the data presented in this evaluation are encouraging. Urine obtained after prostate massage represent a reliable biological sample for a minimally invasive approach

to analyse miRNAs. Because of the anatomical localization of the prostate in relation to the urethra, urine appears as an ideal substrate to obtain biomarkers directly related with prostate carcinogenesis. Urinary exosomes and their cargo become an emerging source of biomarkers that reflects the intercellular communication, which promotes tumorigenesis. MiRNAs, and especially miR-21 and miR-375, come out as valuable biomarkers in the detection and prognosis of PCa. Further studies with larger cohorts are necessary to confirm the utility of urinary miRNAs as PCa biomarkers.

REFERENCES

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;1(136):E359–E386.
2. Montano M. MicroRNAs: miRRORS of health and disease. *Transl Res* 2011;157:157–162.
3. Lui PY, Jin DY, Stevenson NJ. MicroRNA: Master controllers of intracellular signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 2015;72: 3531–3542.
4. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: Oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28:369–378.
5. Erdmann K, Kaulke K, Thomae C, Huebner D, Sergon M, Froehner M, Wirth MP, Fuessel S. Elevated expression of prostate cancer-associated genes is linked to down-regulation of microRNAs. *BMC Cancer* 2014;14:82.
6. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:2257–2261.
7. Filella X, Foj L. MiRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer. *Clin Chem Lab Med* 2016;9: pii: /j/cclm.ahead-of-print/cclm-2015-1073/cclm-2015-1073.xml. doi: 10.1515/cclm-2015-1073
8. Fabris L, Ceder Y, Chinnaiyan AM, Jenster GW, Sorensen KD, Tomlins S, Visakorpi T, Calin GA. The potential of MicroRNAs as prostate cancer biomarkers. *Eur Urol* 2016;70:312–322.
9. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res* 2007;67:6130–6135.
10. Nadiminty N, Tummala R, Lou W, Zhu Y, Shi XB, Zou JX, Chen H, Zhang J, Chen X, Luo J, deVere White RW, Kung HJ, Evans CP, Gao AC. MicroRNA let-7c is downregulated in prostate cancer and suppresses prostate cancer growth. *PLoS ONE* 2012;7:e32832.
11. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105: 10513–10518.
12. Srivastava A, Goldberger H, Dimtchev A, Ramalinga M, Chijioke J, Marian C, Oermann EK, Uhm S, Kim JS, Chen LN, Li X, Berry DL, Kallakury BV, Chauhan SC, Collins SP, Suy S, Kumar D. MicroRNA profiling in prostate cancer—The diagnostic potential of urinary miR-205 and miR-214. *PLoS ONE* 2013;8:e76994.
13. Chen ZH, Zhang GL, Li HR, Luo JD, Li ZX, Chen GM, Yang J. A panel of five circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer. *Prostate* 2012;72:1443–1452.
14. Properzi F, Logozzi M, Fais S. Exosomes: The future of biomarkers in medicine. *Biomark Med* 2013;7:769–778.
15. Ospina-Prieto S, Chaiwangyen W, Herrmann J, Groten T, Schleussner E, Markert UR, Morales-Prieto DM. MicroRNA-141 is upregulated in preeclamptic placentae and regulates trophoblast invasion and intercellular communication. *Transl Res* 2016;172:61–72.
16. Ge Q, Zhou Y, Lu J, Bai Y, Xie X, Lu Z. MiRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions. *Molecules* 2014;19:1568–1575.
17. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13368–13373.
18. Zubiri I, Posada-Ayala M, Benito-Martin A, Maroto AS, Martin-Lorenzo M, Cannata-Ortiz P, de la Cuesta F, Gonzalez-Calero L, Barderas MG, Fernandez-Fernandez B, Ortiz A, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. Kidney tissue proteomics reveals regucalcin downregulation in response to diabetic nephropathy with reflection in urinary exosomes. *Transl Res* 2015;166:474–484. e4
19. Bryzgunova OE, Zaripov MM, Skvortsova TE, Lekchnov EA, Grigor'eva AE, Zaporozhchenko IA, Morozkin ES, Ryabchikova EI, Yurchenko YB, Voitsitskiy VE, Laktionov PP. Comparative study of extracellular vesicles from the urine of healthy individuals and prostate cancer patients. *PLoS ONE* 2016;11:e0157566.
20. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101–1108.
21. Mlcochova H, Hezova R, Meli AC, Slaby O. Urinary MicroRNAs as a new class of noninvasive biomarkers in oncology, nephrology, and cardiology. *Methods Mol Biol* 2015;1218:439–463.
22. Stuoelytė K, Daniūnaitė K, Jankevičius F, Jarmalaitė S. Detection of miRNAs in urine of prostate cancer patients. *Medicina (Kaunas)* 2016;52:116–124.
23. Ahumada-Tamayo S, Saavedra-Briones D, Cantellano-Orozco M, Salido-Guadarrama A, Rodríguez-Dorantes M, Urdiales-Ortiz A, Hernández-Castellanos V, Merayo-Chalico C, Sánchez-Turati G, Santana-Ríos Z, Fulda-Graue S, Pérez-Becerra R, Martínez JA, Fernández-Noyola G, Muñoz-Ibarra E, Camacho-Castro A, García-Salcido F, Morales-Montor G, Pacheco-Gahbler C. MicroRNA determination in urine for prostate cancer detection in Mexican patients at the Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. *Rev Mex Urol* 2011;71:213–217.
24. Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JW, Marsden G, Vessella RL, Rhee B, Kuslich C, Visakorpi T, Hamdy FC. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer* 2012;106:768–774.
25. Witwer KW. Circulating microRNA biomarker studies: Pitfalls and potential solutions. *Clin Chem* 2015;61:56–63.
26. Samsonov R, Shtam T, Burdakov V, Glotov A, Tsyrlina E, Berstein L, Nosov A, Evtushenko V, Filatov M, Malek A. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation

- followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic. *Prostate* 2016;76:68–79.
27. Cheng HH, Mitchell PS, Kroh EM, Dowell AE, Chéry L, Siddiqui J, Nelson PS, Vessella RL, Knudsen BS, Chinnaiyan AM, Pienta KJ, Morrissey C, Tewari M. Circulating microRNA profiling identifies a subset of metastatic prostate cancer patients with evidence of cancer associated hypoxia. *PLoS ONE* 2013;8:e69239.
 28. Yaman Agaoglu F, Kovancilar M, Dizdar Y, Darendeliler E, Holdenrieder S, Dalay N, Gezer U. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour Biol* 2011;32:583–588.
 29. Selth LA, Townley S, Gillis JL, Ochnik AM, Murti K, Macfarlane RJ, Chi KN, Marshall VR, Tilley WD, Butler LM. Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease. *Int J Cancer* 2012;131:652–661.
 30. Li M, Rai AJ, DeCastro GJ, Zeringer E, Barta T, Magdaleno S, Setterquist R, Vlassov AV. An optimized procedure for exosome isolation and analysis using serum samples: Application to cancer biomarker discovery. *Methods* 2015;87:26–30.
 31. Rubin MA, Girelli G, Demichelis F. Genomic correlates to the newly proposed grading prognostic groups for prostate cancer. *Eur Urol* 2016;69:557–560.
 32. Carter HB, Partin AW, Walsh PC, Trock BJ, Veltri RW, Nelson WG, Coffey DS, Singer EA, Epstein JI. Gleason score 6 adenocarcinoma: Should it be labeled as cancer? *J Clin Oncol* 2012;30:4294–4296.
 33. Kulac I, Haffner MC, Yegnasubramanian S, Epstein JI, De Marzo AM. Should Gleason 6 be labeled as cancer? *Curr Opin Urol* 2015;25:238–245.
 34. Stephan C, Jung M, Rabenhorst S, Kilic E, Jung K. Urinary miR-183 and miR-205 do not surpass PCA3 in urine as predictive markers for prostate biopsy outcome despite their highly dysregulated expression in prostate cancer tissue. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:1109–1118.
 35. Sapre N, Hong MK, Macintyre G, Lewis H, Kowalczyk A, Costello AJ, Corcoran NM, Hovens CM. Curated microRNAs in urine and blood fail to validate as predictive biomarkers for high-risk prostate cancer. *PLoS ONE* 2014;9:e91729.
 36. Lewis H, Lance R, Troyer D, Beydoun H, Hadley M, Orians J, Benzine T, Madric K, Semmes OJ, Drake R, Esquela-Kerscher A. MiR-888 is an expressed prostatic secretions-derived microRNA that promotes prostate cell growth and migration. *Cell Cycle* 2014;13:227–239.
 37. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Fondurulia J, Chen MH, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Wein A, Richie JP. Clinical utility of the percentage of positive prostate biopsies in defining biochemical outcome after radical prostatectomy for patients with clinically localized prostate cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:1164–1172.
 38. Boorjian SA, Karnes RJ, Rangel LJ, Bergstralh EJ, Blute ML. Mayo Clinic validation of the D'Amico risk group classification for predicting survival following radical prostatectomy. *J Urol* 2008;179:1354–1360.
 39. Huang X, Yuan T, Liang M, Du M, Xia S, Dittmar R, Wang D, See W, Costello BA, Quevedo F, Tan W, Nandy D, Bevan GH, Longenbach S, Sun Z, Lu Y, Wang T, Thibodeau SN, Boardman L, Kohli M, Wang L. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol* 2015;67:33–41.
 40. Wang SY, Shiboski S, Belair CD, Cooperberg MR, Simko JP, Stoppler H, Cowan J, Carroll PR, Blleloch R. MiR-19, miR-345, miR-519c-5p serum levels predict adverse pathology in prostate cancer patients eligible for active surveillance. *PLoS ONE* 2014;9:e98597.
 41. Guan Y, Wu Y, Liu Y, Ni J, Nong S. Association of microRNA-21 expression with clinicopathological characteristics and the risk of progression in advanced prostate cancer patients receiving androgen deprivation therapy. *Prostate* 2016;76:986–993.
 42. Leite KR, Reis ST, Viana N, Morais DR, Moura CM, Silva IA, Pontes J, Jr, Katz B, Srougi M. Controlling recc miR21 promotes tumor cell invasion and is related to biochemical recurrence in prostate cancer. *J Cancer* 2015;6:292–301.
 43. Mishra S, Deng JJ, Gowda PS, Rao MK, Lin CL, Chen CL, Huang T, Sun LZ. Androgen receptor and microRNA-21 axis downregulates transforming growth factor beta receptor II (TGFB2) expression in prostate cancer. *Oncogene* 2014;33:4097–4106.
 44. Coppola V, Musumeci M, Patrizii M, Cannistraci A, Addario A, Maugeri-Saccà M, Biffoni M, Francescangeli F, Cordenosi M, Piccolo S, Memeo L, Pagliuca A, Muto G, Zeuner A, De Maria R, Bonci D. BTG2 loss and miR-21 upregulation contribute to prostate cell transformation by inducing luminal markers expression and epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 2013;32:1843–1853.
 45. Mao XH, Chen M, Wang Y, Cui PG, Liu SB, Xu ZY. MicroRNA-21 regulates the ERK/NF- κ B signaling pathway to affect the proliferation, migration and apoptosis of human melanoma A375 cells by targeting SPRY1, PDCD4 and PTEN. *Mol Carcinog* 2016;17. doi: 10.1002/mc.22542
 46. Liu LZ, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, Kung HF, Lai L, Jiang BH. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression. *PLoS ONE* 2011;6:e19139.
 47. Li T, Li D, Sha JJ, Sun P, and Huang YR. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;383:280–285.
 48. Lawson DA, Zong Y, Memarzadeh S, Xin L, Huang J, Witte ON. Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:2610–2615.
 49. Ribas J, Ni X, Haffner M, Wentzel EA, Salmasi AH, Chowdhury WH, Kudrolli TA, Yegnasubramanian S, Luo J, Rodriguez R, Mendell JT, Lupold SE. MiR-21: An androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer Res* 2009;69:7165–7169.
 50. Pickl JM, Tichy D, Kuryshv VY, Tolstov Y, Falkenstein M, Schüler J. Ago-RIP-Seq identifies Polycomb repressive complex I member CBX7 as a major target of miR-375 in prostate cancer progression. *Oncotarget* 2016;20. doi: 10.18632/oncotarget.10729
 51. Selth LA, Das R, Townley SL, Coutinho I, Hanson AR, Centenera MM, Stylianou N, Sweeney K, Soekmadji C, Jovanovic L, Nelson CC, Zoubeidi A, Butler LM, Goodall GJ, Hollier BG, Gregory PA, Tilley WD. A ZEB1-miR-375-YAP1 pathway regulates epithelial plasticity in prostate cancer. *Oncogene* 2016;6. doi: 10.1038/onc.2016.185

AGRAÏMENTS

Al Dr. Xavier Filella, per haver-me acompanyat, guiat i motivat durant tot aquest llarg camí. Per creure en mi més que jo mateixa.

Al Dr. Wladimiro Jiménez, per permetre'm realitzar els experiments i donar-me un lloc al Servei de Bioquímica i Genètica Molecular.

A totes les tècnics del laboratori, per ensenyar-me genètica i per la seva disponibilitat.

A la Montse Bernat, per facilitar-me sempre la feina i per la seva contribució en la meva tesi.

A l'Ana Bernal, la Susana i la Paula, per la seva contribució en la meva tesi, i per la seva gran disponibilitat i amistat.

Al Blai, a la Marina i al Chema per animar-me a tirar endavant i no deixar que em desanimés.

A l'Alba, l'Estefi i la Francisca, per orientar-me, ensenyar-me, donar-me idees i animar-me en els moments més difícils. Per parlar de genètica fins i tot al bar. Per fer que la meva estada fos més dolça.

Als meus avis, per impulsar-me a fer les coses sempre lo millor possible.

Als meus pares, per ensenyar-me a anar més enllà, i a creure en l'impossible.

A la petita Núria, per obligar-me a desconnectar totalment i a tornar a la feina amb més energia i ànims renovats, i als seus pares.