

Cáncer de Próstata: Marcadores Moleculares en la era de la Proteómica y la Medicina Personalizada

Paula Alejandra Sacca.

Laboratorio de proteoglicanos y matriz extracelular. IByME. CABA, Argentina. email: sacca@dna.uba.ar

Introducción

El Cáncer de Próstata (CaP) es el tercer cáncer más común entre los hombres en el mundo y el primero en la Argentina en el año 2006 (www.ms.gba.gov.ar/Educación_salud/CancerProstata.htm).

Los tumores de próstata son inicialmente dependientes de los andrógenos para crecer y tienen una historia natural generalmente benigna. La cirugía temprana o la radioterapia son efectivas para la enfermedad localizada. Los hombres que presentan la enfermedad localmente avanzada o metastásica son usualmente tratados con ablación de andrógenos, tratamiento que conduce a una regresión transitoria del tumor. Sin embargo, la mayoría de estos pacientes desarrolla la enfermedad refractaria a hormonas dentro de los 2 a 3 años y tiene niveles elevados del antígeno prostático específico (PSA). Hasta el momento no hay terapia efectiva para esta forma de la enfermedad. El mecanismo por el cual los tumores adquieren independencia a los andrógenos aún no se ha determinado. La patología molecular del CaP es compleja ya que están involucrados múltiples genes en su patogénesis, como así también factores ambientales, la dieta y la inflamación (1).

Los marcadores moleculares son útiles para detectar el cáncer, determinar el pronóstico y monitorear la progresión de la enfermedad o la respuesta a la terapia; también pueden constituir nuevos blancos terapéuticos, conducir a avances en métodos diagnósticos e identificar otras moléculas importantes relacionadas con el desarrollo del cáncer y su progresión.

Los requisitos ideales para que un nuevo marcador pueda ser útil son: ser capaz de distinguir entre CaP e hiperplasia benigna de próstata (HBP); tener alta sensibilidad, especificidad y valor predictivo; ser reproducible; distinguir tumores potencialmente capaces de hacer peligrar la vida de los que son de lento crecimiento. Además, debe tener bajo costo; poder determinarse a través de un ensayo técnicamente fácil y no invasivo (2) y ser independiente de los predictores ya aceptados, es decir, el estadio clínico y patológico, el grado de Gleason y el PSA (3). Los marcadores que son usados para seleccionar pacientes en alto riesgo o para monitorear recidivas pueden tener mucha menor especificidad pero requieren alta sensibilidad. Varios estudios han señalado que la combinación racional de biomarcadores podría alcanzar un

nivel mayor de especificidad y sensibilidad que un único biomarcador, ya que éste podría presentar tales características sólo para un determinado estadio o etiología molecular (4, 5).

La identificación de marcadores moleculares permitirá a los especialistas diagnosticar el cáncer en forma temprana y los ayudará a responder tres preguntas que son de suma importancia en la toma de la decisión óptima que se plantea en los pacientes con CaP: si se requiere o no terapia local; en caso que la terapia local sea necesaria, cuál es el tratamiento de elección y qué terapia es la más adecuada si la metástasis está presente (6).

El advenimiento de la medicina personalizada para el tratamiento de las enfermedades oncológicas será útil para proponer tratamientos altamente específicos para cada paciente, con los menores efectos adversos, utilizando múltiples marcadores moleculares para monitorear tanto la eficacia como la toxicidad del tratamiento.

El ejemplo más destacado de la utilidad de los marcadores moleculares es el del cáncer de mama, dado que el perfil molecular de la paciente ha mostrado ser sustancialmente predictivo del pronóstico y de la respuesta a las terapias citotóxicas (7). En esta patología se realizan análisis rutinarios de los receptores de estrógenos y progesterona y HER2, para evaluar la receptividad de la terapia anti-hormonal o gen-específica. Aunque el CaP tiene una frecuencia e importancia clínica similar al cáncer de mama, ningún parámetro molecular es analizado rutinariamente y han sido infructuosos los numerosos intentos para mejorar la evaluación utilizando perfiles moleculares (6).

El progreso limitado en las investigaciones en CaP puede deberse en parte a sus propiedades particulares como así también a problemas logísticos, dada la escasez o pérdida de tejido prostático, que debe ser obtenido en el momento apropiado con respecto a la historia natural de la enfermedad o a su respuesta terapéutica. Por ejemplo, el tejido de pacientes en observación y espera o que tienen cánceres avanzados insensibles a hormonas prácticamente no está disponible (6). En contraste con el cáncer de mama, los tejidos no fijados/congelados son raramente recolectados en CaP, lo cual impide que se lleven a cabo ciertos perfiles moleculares.

La era postgenómica es prometedora en la búsqueda y validación de los biomarcadores en los tumores humanos

debido a los avances en las herramientas de investigación en el campo de la tecnología molecular, tales como los micro arreglos de ADN, la proteómica, la nanobiotecnología, las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), el ADN complementario, las alteraciones de microsátélites y el campo de la metilómica y los biomarcadores de ARN y la citogenética.

En esta revisión se describen algunos de los biomarcadores ya establecidos para la detección del CaP como así también otros emergentes y se discute el estado actual de su utilidad.

Marcadores circulantes en sangre

El PSA tiene un gran impacto en el diagnóstico y seguimiento del CaP, sin embargo, su uso sigue siendo controvertido debido a que cambios en la epidemiología del CaP han limitado su rol pronóstico. Para aumentar la especificidad del PSA total, se han investigado diversas propuestas basadas en derivados del mismo, por ejemplo, valores de PSA específicos de la edad, densidad del PSA, PSA de la zona de transición, velocidad del PSA y la evaluación de diferentes isoformas del PSA (8, 9). Se están realizando estudios multicéntricos de reproducibilidad y validación del PSA, utilizando análisis de alto rendimiento, genómica bidimensional, proteómica y auto anticuerpos (10).

Algunos de los marcadores en sangre que se encuentran actualmente bajo investigación son: kalikreina glandular humana, antígenos tempranos de CaP, factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1) y sus proteínas de unión (IGFBP-2 y IGFBP-3), sistema de activación del plasminógeno tipo urokinasa, factor de crecimiento transformante β -1 (TGF β -1), interleukina-6, cromogranina A, proteína secretoria prostática y antígeno de membrana específico (9,11). Asimismo, la detección *in situ* de proteasas activas es crucial para investigar los estadios tempranos del CaP.

Marcadores de apoptosis y de la regulación del ciclo celular

p53: es un gen supresor tumoral. Numerosos estudios observaron aumento de la acumulación de p53 nuclear en el CaP metastásico, recurrente y/o insensible a los andrógenos, respecto a la enfermedad clínicamente localizada (3). Sin embargo, no hay consenso en el valor de corte para la acumulación de esta proteína, y el rango de p53 alterado varía entre 4 a 61% (6). Por otro lado, la secuenciación de p53 mostró que la tasa verdadera de mutaciones no es mucho mayor que el 10% (12). A pesar de que p53 es un marcador pronóstico, tiene limitaciones prácticas y clínicas debido a la heterogeneidad de la aberración en la enfermedad localizada.

Bcl-2: Es una proteína inhibidora de la apoptosis. Su sobre expresión se ha asociado tanto con resistencia a la radioterapia (13) como con resistencia a los andrógenos en CaP avanzado (14). Bcl-2 es útil como biomarcador de la respuesta a la terapia y también como pronóstico en tumores relativamente avanzados; por lo tanto, las decisiones de tratamiento deberían basarse en los hallazgos obtenidos en los tejidos de lesiones recurrentes o metastásicas.

p27, p21 y p16: p27 es un gen supresor tumoral. La disminución o pérdida de la expresión de p27 en CaP es un marcador pronóstico asociado con falla al tratamiento después de la prostatectomía (15). Los CaP primarios con bajos niveles de la proteína p27 son biológicamente más agresivos, mientras que los tumores con altos niveles de p27 son más sensibles a la ablación de andrógenos. Una comparación entre la inmun expresión de p21 y p27 en glándulas benignas, neoplasia intra epitelial (PIN) y CaP, mostró que altos niveles de p21 y bajos niveles de p27 correlacionaron con factores de pronóstico adverso del CaP (16). **p16:** es regulador del arresto del ciclo celular en la fase G1. En un estudio randomizado en fase III donde se compara la terapia de privación de andrógenos a

largo plazo y a tiempos cortos, se encontró que bajos niveles de esta proteína estaban asociados a un alto riesgo de metástasis distantes (17) y que la pérdida de p16 estaba asociada con un pronóstico clínico adverso en CaP localmente avanzado (18).

c-myc: La amplificación de este oncogen se asoció con aumento del grado de Gleason y con el estadio clínico. Predice resultados adversos en respuesta a la terapia aplicada en pacientes con enfermedad localmente avanzada (1, 19). Una serie de trabajos describió que la amplificación de c-myc aumenta en la transición de PIN a CaP localizado, y de éste a metástasis (3, 20). Dvoráková y col (2007) (21) encontraron que la disminución de la expresión de p27^{Kip1} estaba relacionada con la amplificación de c-myc. En un modelo preclínico se observó que el CaP refractario a hormonas respondió a la quimioterapia con doxetaxel cuando se realizó la inhibición combinada de c-myc y bcl-2 con oligonucleótidos antisentido (22).

Receptor de andrógenos

La expresión del receptor de andrógenos (RA) representa el marcador más obvio de pronóstico y de la respuesta a hormonas. Numerosos trabajos han demostrado que la sobre expresión del RA, su amplificación o su mutación están asociadas a la progresión, recurrencia y metástasis en nódulo linfático y/o a la resistencia anti androgénica (3). En pacientes *naive* a hormonas, la determinación cuantitativa del ARNm del RA en células tumorales y benignas obtenidas de

prostatectomías radicales por microdissección con láser, mostró que el nivel de expresión puede ser útil para predecir la recurrencia del CaP (23). Las mutaciones del RA son raras en el tumor primario, mientras que su frecuencia aumenta entre un 10-40% en la enfermedad hormono independiente (24). Se acepta actualmente que la falta de respuesta al tratamiento hormonal en algunos subgrupos de pacientes puede deberse entre otras causas, a mutaciones del RA y/o a la activación promiscua de diferentes variantes del mismo. Los mecanismos por los cuales las formas mutantes son activadas y cómo éstas modifican la expresión del gen aún no se conocen (25). Los receptores activados por ligandos no androgénicos parecen comportarse en forma diferente a los activados por andrógenos tanto en su mecanismo de activación como en su patrón de regulación de genes (26).

Marcadores de Adhesión celular E-cadherina y β -catenina y Wnt:

E-cadherina es una proteína de membrana involucrada en la regulación de la adhesión célula-célula y que interactúa con las cateninas proteínas citoplasmáticas, Saha y col (2008) (27) demostraron que hay sobreexpresión de E-cadherina y β -catenina en la membrana de las células de CaP metastásicas en el hueso, y que esta alta expresión sugiere su participación en la adhesión intercelular de las células metastásicas en dicho sitio. Así, la E-cadherina y sus moléculas relacionadas las cateninas son potenciales marcadores de pronóstico, ya que en el epitelio normal y en células invasoras primarias de CaP está bien documentada la reducción o pérdida de estas proteínas (28).

El camino de señalización por las proteínas Wnt está relacionado con la polaridad celular, el patrón tisular, el control de la proliferación y el desarrollo de neoplasias. El aumento de la expresión de Wnt se correlacionó con un aumento del grado de Gleason y los niveles de PSA (29). También se ha reportado que puede promover el establecimiento de células de CaP en el microambiente del hueso y estimular la formación del mismo (30).

Metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs)

Las MMPs juegan un rol clave en la patogénesis de la invasión y la metástasis al hueso. Un estudio realizado en pacientes con CaP reportó que la actividad de la MMP-9 y de MMP-2 en suero está asociada con la progresión y metástasis (31). La MT1-MMP es la principal mediadora de la degradación del colágeno I. A través del uso de microarreglos de ADN, Cao y col (2008) (32) identificaron sobreexpresión de MT1MMP en CaP primario y metastásico con respecto al tejido benigno. Usando modelos *in vitro* observaron que MT1-MMP juega un rol importante en la diseminación temprana de las células tumorales al inducir la transición celular de epitelial a

mesenquimal. Otro estudio reportó una expresión heterogénea de MT1MMP en tejido primario de CaP, mientras que las células tumorales metastásicas en hueso mostraron una expresión abundante y uniforme (33). Así, las MMPs pueden ser útiles como marcadores de progresión y metástasis a hueso y ser blancos terapéuticos prometedores para este estadio de la enfermedad.

Marcadores de genes metilados

La metilación del ADN es un importante mecanismo epigenético de la regulación genética; en el cáncer ocurre en forma aberrante y conduce al silenciamiento de genes. La hipermetilación GSTP1 es la alteración molecular más común en el CaP. Woodson y col (2007) (34) observaron alta frecuencia de la metilación de GSTP1 en la orina de hombres con estadio III (100%) *vs* estadio II (20%) de la enfermedad. Sugirieron que la detección de este parámetro en prediagnóstico puede aumentar la especificidad del PSA y puede distinguir CaP de HBP. La hipermetilación de GSTP1 permite distinguir entre atrofia inflamatoria proliferativa y PIN intraepitelial y su transición a CaP (1). Sin embargo, hasta el momento la utilidad clínica de la detección de la metilación de genes no se ha establecido definitivamente.

Marcadores encontrados mediante la expresión de genes por microarreglos

La aplicación de la tecnología de microarreglos de ADN, que permite la expresión de todos o casi todos los genes del genoma humano, condujo a un aumento extraordinario en el descubrimiento de biomarcadores en cáncer.

AMACR (alfa-metilacil CoA racemasa): Es una enzima que cataliza la conversión isomérica de los ácidos grasos y participa en la β -oxidación de las cadenas ramificadas de los mismos. Un estudio multicéntrico con 807 muestras de pacientes, mostró que la proteína AMACR, tenía una sensibilidad y especificidad del 97% y 92% respectivamente para la detección del CaP (35). Su sobreexpresión se está utilizando en numerosas instituciones como marcador de diagnóstico, ya que ayuda a distinguir entre CaP y HBP (36). Otros trabajos demostraron que es posible detectar esta proteína en secreciones prostáticas (37) y en orina (38) convirtiéndola en un biomarcador no invasivo prometedor. Levin y col (2007)(39), realizando un análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNP) confirmaron que hay relación entre el gen AMACR y el riesgo familiar del CaP, dado que variaciones en la expresión de este gen pueden estar asociadas a la línea germinal.

Gen polycomb EZH2: es un componente del complejo represor Polycomb 2, que inicia la represión transcripcional estable en la embriogénesis temprana. Este gen está sobreexpresado en CaP refractario a hormonas y CaP metastático (40). Así, EZH2 es un marcador que puede distinguir CaP indolente de aquel con alto riesgo de progresión letal (41). Yu y col (2007) (42) concluyeron que las proteínas del complejo polycomb están funcionalmente vinculadas con las células madre, con la metástasis y la supervivencia del cáncer.

A pesar de estos éxitos, hay limitaciones en la aplicación de la tecnología de microarreglos en el CaP. A diferencia de lo ocurrido con otros tumores, este enfoque no ha permitido establecer una clasificación consistente.

Marcadores de proteínas de genes de fusión

El evento genético más frecuente asociado al CaP es la expresión del gen de fusión TMPRSS2:ERG. En pacientes sometidos a cirugía de CaP clínicamente localizado, se encontró que el subgrupo que expresa la proteína de fusión tiene un riesgo de recurrencia significativamente mayor (58,4% a los 5 años) que los pacientes que no la expresan (8,1%). Además, la expresión de este gen es un importante factor pronóstico, independiente del grado del tumor, del estadio y del PSA (43). La detección de TMPRSS2:ERG mediante PCR cuantitativa puede realizarse en orina. Este método tiene la ventaja de ser no invasivo, pudiendo ser empleado en grandes estudios prospectivos para la detección del CaP (44). El estado de este gen permitirá identificar precozmente a los pacientes con alto riesgo de progresión, quienes tendrán entonces mayor probabilidad de beneficiarse con la terapia.

Marcadores de células madre

Las células madre en cáncer son un subgrupo de células tumorales responsables de la iniciación y mantenimiento de la enfermedad (45). Estas células son resistentes a la irradiación y a drogas antitumorales (46). Collins y col (2007) (47) encontraron en una serie de tumores de próstata, con diferentes grados de Gleason y estados metastásicos, que el 0,1 % de las células expresaban el fenotipo CD44+/alfa2beta hi/ CD133+ de células madre tumorales, y que no había correlación entre el número de las células de CD44+/ alpha2beta1hi/CD133+ y el grado del tumor. El estudio de marcadores de las células madre tumorales ayudará a comprender el origen del CaP como así también contribuirá al desarrollo de terapias dirigidas contra dichas células.

Marcadores de estrés oxidativo

La respuesta celular al estrés es importante para la protección y el mantenimiento de la fisiología celular. El estrés oxidativo en el CaP es un reconocido factor etiológico en el desarrollo de esta enfermedad (48). La

inflamación crónica generada por las especies reactivas de oxígeno provoca daño a las estructuras celulares y conduce a un aumento de la proliferación como respuesta compensatoria a la muerte celular. La proteína hemo oxigenasa-1 (HO-1) tiene efectos citoprotectores contra el daño oxidativo y se piensa que su modulación juega un rol en la carcinogénesis de la próstata. Recientemente, demostramos que la expresión y la localización nuclear de HO-1 pueden definir un nuevo subgrupo de pacientes con CaP primario (49). Encontramos una diferencia significativa en la localización nuclear de HO-1 en los pacientes con CaP (65%, Gleason entre 4-9) vs HBP (23%). Estudios futuros intentarán correlacionar la expresión nuclear de HO-1 con la progresión de la enfermedad para cada grado de Gleason y mostrar así un valor predictivo para dicho parámetro (49).

Biomarcadores de imágenes

La imagen es un poderoso biomarcador que puede proveer información acerca de la genética, la bioquímica y los procesos fisiológicos y anatómicos del cáncer. La evaluación clínica de la respuesta al tratamiento en el CaP refractario a hormonas es importante dada la alta incidencia de la metástasis en hueso. Lee y col (2007) (50) utilizaron la técnica del mapa de difusión funcional (fDM) para evaluar la respuesta al tratamiento en un modelo preclínico de CaP metastático. Esta técnica es usada para cuantificar espacialmente los cambios en la difusión del agua dentro del tejido tumoral, inducidos por los tratamientos. Hosii y col (2007) (51) realizaron un estudio en 120 pacientes utilizando la técnica de resonancia magnética por imágenes (MRI) y observaron que la densidad del PSA en la zona de transición tiene valor predictivo significativo para la detección del CaP.

La metabolómica oncológica estudia la bioquímica que conduce a la transformación maligna. Trabajos recientes determinaron *in vivo* la presencia de metabolitos cruciales que indican lesiones cancerosas utilizando MRI; esta técnica tiene un futuro promisorio ya que además de ayudar a elegir el tratamiento más adecuado puede predecir la respuesta al mismo de una manera no invasiva para los pacientes con CaP (52).

Proteómica

La proteómica es usada para la identificación de biomarcadores en cáncer. La oncoproteómica es la aplicación del campo de la proteómica a la oncología y contribuye al desarrollo del manejo personalizado del paciente. El diagnóstico molecular, la microdissección por captura láser y los biochips de proteínas, son las herramientas que tienen mayor impacto en la oncoproteómica. La nanoproteómica mejoró notablemente los protocolos corrientes de purificación y exhibición de las proteínas, tanto como la identificación automatizada de trazas de las mismas en muestras mínimas

(53). Mediante el uso de electroforesis bidimensional y espectrometría de masa acoplada a analizadores de tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS/MS) se analizaron muestras de biopsias de aguja y se detectaron numerosas proteínas que exhiben cambios significativos entre CaP y HBP. Los 2 grupos mas notables de proteínas identificadas son co-reguladores latentes del receptor de andrógenos (FLNA(7-15) y FKBP4) y enzimas involucradas en la beta oxidación mitocondrial de ácidos grasos (DCI y ECHSI). Se observó también un desbalance en la expresión de subtipos de la peroxiredoxina y se identificaron isoformas modificadas de las proteínas de estrés térmico HSP27 y HSP70 (54). Actualmente se están realizando validaciones multicéntricas de perfiles proteómicos de muestras de suero para detectar el CaP (55).

Conclusiones

El mayor desafío científico de esta era será la estandarización de los parámetros técnicos entre los laboratorios, la validación y los adecuados controles de calidad de los numerosos biomarcadores potenciales existentes. Las validaciones deberán realizarse en múltiples centros internacionales, con grupos de pacientes suficientemente grandes, bien caracterizados clínicamente y a través de protocolos bien definidos (56). En el futuro el pronóstico del cáncer deberá basarse en pequeños paneles de marcadores que predigan en forma precisa la presencia del mismo, el estadio y la metástasis. Los biomarcadores ayudarán a dividir a los pacientes en sub-grupos biológicos para poder responder con mayor seguridad las preguntas específicas concernientes al manejo del paciente con cáncer. Finalmente, la medicina personalizada esta comenzando a ser reconocida y probablemente forme parte de la práctica clínica en la próxima década.

Agradecimientos

Deseo agradecer al Dr. O. Mazza y a la Lic. V. Julianelli por la lectura crítica de este manuscrito.

Referencias

- Hughes, C.; Murphy, A.; Martin, C. and col. Molecular Pathology of Prostate Cancer. *J Clin Pathol* 58:673-684, 2005.
- Chodak, G. Prostate Cancer: Epidemiology, Screening, and Biomarkers. *Rev Urol* 8 Suppl 2:S3-S8, 2006.
- Quinn DI, Henshall SM, Sutherland RL. Molecular Markers of Prostate Cancer Outcome. *Eur J Cancer* 41:858-887, 2005.
- Petricoin, E.F.; Belluco, C.; Araujo, R. P. and col. The Blood Peptidome: a Higher Dimension of Information Content for Cancer Biomarker Discovery. *Nat Rev Cancer* 6:961-967, 2006.
- Wang, X. D.; Reeves, K.; Luo, F. R. y col. Identification of Candidate Predictive and Surrogate Molecular Markers for Dasatinib in Prostate Cancer: Rationale for Patient Selection and Efficacy Monitoring. *Genome Biol* 8:R255-, 2007.
- Schlomm, T.; Erbersdobler, A.; Mirlacher, M.y col. Molecular Staging of Prostate Cancer in the Year 2007. *World J Urol* 25:19-30, 2007.
- Andre, F.; Puszta, L. Molecular Classification of Breast Cancer: Implications for Selection of Adjuvant Chemotherapy. *Nat Clin Pract Oncol* 3:621-632, 2006.
- Bensalah, K.; Lotan, Y.; Karam, J. A. y col. New Circulating Biomarkers for Prostate Cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2007.
- Shariat, S. F.; Karam, J. A.; Margulis, V.;y col. New Blood-Based Biomarkers for the Diagnosis, Staging and Prognosis of Prostate Cancer. *BJU Int*, 2007.
- Parekh, D. J.; Ankerst, D. P.; Troyer, D y col. Biomarkers for Prostate Cancer Detection. *J Urol* 178:2252-2259, 2007.
- Steuber, T.; Helo, P.; Lilja, H. Circulating Biomarkers for Prostate Cancer. *World J Urol* 25:111-119, 2007.
- Hall, M. C.; Navone, N. M.; Troncoso, P. y col. Frequency and Characterization of P53 Mutations in Clinically Localized Prostate Cancer. *Urology* 45:470-475, 1995.
- Khor, L. Y.; DeSilvio, M.; Li, R. y col. Bcl-2 and Bax Expression and Prostate Cancer Outcome in Men Treated With Radiotherapy in Radiation Therapy Oncology Group Protocol 86-10. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66:25-30, 2006.
- Zellweger, T.; Ninck, C.; Bloch M y col. Expression Patterns of Potential Therapeutic Targets in Prostate Cancer. *Int J Cancer* 113:619-628, 2005.
- Revelosl, K.; Petraki, C.; Gregorakis, A. y col. P27(Kip1) and Ki-67 (MIB1) Immunohistochemical Expression in Radical Prostatectomy Specimens of Patients With Clinically Localized Prostate Cancer. *In Vivo* 19:911-920, 2005.
- Doganavsargil, B.; Sirmsir, A.; Boyacioglu, H. y Col. A Comparison of P21 and P27 Immunoeexpression in Benign Glands, Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Prostate Adenocarcinoma. *BJU Int* 97:644-648, 2006.
- Chakravarti, A.; DeSilvio, M.; Zhang, M. y col. Prognostic Value of P16 in Locally Advanced Prostate Cancer: a Study Based on Radiation Therapy Oncology Group Protocol 9202. *J Clin Oncol* 25:3082-3089, 2007.
- Chakravarti, A.; Heydon, K.; Wu, C. L. y col. Loss of P16 Expression Is of Prognostic Significance in Locally Advanced Prostate Cancer: an Analysis From the Radiation Therapy Oncology Group Protocol 86-10. *J Clin Oncol* 21:3328-3334, 2003.
- Sole, X.; Hernandez, P.; Lopez, D. H. y col. Genetic and Genomic Analysis Modeling of Germline C-MYC Overexpression and Cancer Susceptibility. *BMC Genomics* 9:12-, 2008.
- Qian, J.; Hirasawa, K.; Bostwick, D. G. y col. Loss of P53 and C-Myc Overrepresentation in Stage T(2-3) N(1-3)M(0) Prostate Cancer Are Potential Markers for Cancer Progression. *Mod Pathol* 15:35-44, 2002.
- Dvorackova, J.; Uvirova, M. A Molecularly Genetic Determination of Prognostic Factors of the Prostate Cancer

- and Their Relationships to Expression of Protein P27kip1. *Neoplasma* 54:149-154, 2007.
22. **Leonetti, C.; Biroccio, A.; D'Angelo, C. y col.** Therapeutic Integration of C-Myc and Bcl-2 Antisense Molecules With Docetaxel in a Preclinical Model of Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Prostate* 67:1475-1485, 2007.
 23. **Rosner, I. L.; Ravindranath, L.; Furusato, B. y col.** Higher Tumor to Benign Ratio of the Androgen Receptor mRNA Expression Associates With Prostate Cancer Progression After Radical Prostatectomy. *Urology* 70:1225-1229, 2007.
 24. **Marcelli, M.; Ittmann, M.; Mariani, S. y col.** Androgen Receptor Mutations in Prostate Cancer. *Cancer Res* 60:944-949, 2000.
 25. **Taplin, M. E.** Drug Insight: Role of the Androgen Receptor in the Development and Progression of Prostate Cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 4:236-244, 2007.
 26. **Brooke, G. N.; Parker, M. G.; Bevan, C. L.** Mechanisms of Androgen Receptor Activation in Advanced Prostate Cancer: Differential Co-Activator Recruitment and Gene Expression. *Oncogene*, 2007.
 27. **Saha, B.; Arase, A.; Imam, S. S. y col.** Overexpression of E-Cadherin and Beta-Catenin Proteins in Metastatic Prostate Cancer Cells in Bone. *Prostate* 68:78-84, 2008.
 28. **Kallakury, B.V.; Sheehan, C. E.; Winn-Deen, E. y col.** Decreased Expression of Catenins (Alpha and Beta), P120 CTN, and E-Cadherin Cell Adhesion Proteins and E-Cadherin Gene Promoter Methylation in Prostatic Adenocarcinomas. *Cancer* 92:2786-2795, 2001.
 29. **Chen, G.; Shukeir, N.; Potti, A. y col.** Up-Regulation of Wnt-1 and Beta-Catenin Production in Patients With Advanced Metastatic Prostate Carcinoma: Potential Pathogenetic and Prognostic Implications. *Cancer* 101:1345-1356, 2004.
 30. **Emami, K. H.; Corey, E.** When Prostate Cancer Meets Bone: Control by Wnts. *Cancer Lett* 253:170-179, 2007.
 31. **Zhang, L.; Shi, J.; Feng, J. y col.** Type IV Collagenase (Matrix Metalloproteinase-2 and -9) in Prostate Cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 7:327-332, 2004
 32. **Cao, J.; Chiarelli, C.; Richman, O. y col.** Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in Prostate Cancer. *J Biol Chem*, 2008.
 33. **Bonfil, R. D.; Dong, Z.; Trindade Filho, J. C. y col.** Prostate Cancer-Associated Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase: a Pivotal Role in Bone Response and Intraosseous Tumor Growth. *Am J Pathol* 170:2100-2111, 2007.
 34. **Woodson, K.; O'Reilly, K. J.; Hanson, J. C. y col.** The Usefulness of the Detection of GSTP1 Methylation in Urine As a Biomarker in the Diagnosis of Prostate Cancer. *J Urol*, 2007.
 35. **Jiang, Z.; Wu, C. L.; Woda, B. A. y col.** Alpha-Methylacyl-CoA Racemase: a Multi-Institutional Study of a New Prostate Cancer Marker. *Histopathology* 45:218-225, 2004.
 36. **Bradford, T. J.; Tomlins, S. A.; Wang, X. y Col.** Molecular Markers of Prostate Cancer. *Urol Oncol* 24:538-551, 2006.
 37. **Zielie, P. J.; Mobley, J. A.; Ebb, R. G. y col.** A Novel Diagnostic Test for Prostate Cancer Emerges From the Determination of Alpha-Methylacyl-Coenzyme a Racemase in Prostatic Secretions. *J Urol* 172:1130-1133, 2004.
 38. **Rogers, C. G.; Yan, G.; Zha, S. y col.** Prostate Cancer Detection on Urinalysis for Alpha Methylacyl Coenzyme a Racemase Protein. *J Urol* 172:1501-1503, 2004
 39. **Levin, A. M.; Zuhlke, K. A.; Ray, A. y Col.** Sequence Variation in Alpha-Methylacyl-CoA Racemase and Risk of Early-Onset and Familial Prostate Cancer. *Prostate* 67:1507-1513, 2007.
 40. **Saramaki, O. R.; Tammela, T. L.; Martikainen, P. M. y Col.** The Gene for Polycomb Group Protein Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) Is Amplified in LateStage Prostate Cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 45:639-645, 2006
 41. **Hoshii, T.; Nishiyama, T.; Toyabe, S. y col.** Evaluation of Magnetic Resonance Imaging-Based ProstateSpecific Antigen Density of the Prostate in the Diagnosis of Prostate Cancer. *Int J Urol* 14:305-310, 2007. **Hoshii, T.; Nishiyama, T.; Toyabe, S. y col.** Evaluation of Magnetic Resonance Imaging-Based ProstateSpecific Antigen Density of the Prostate in the Diagnosis of Prostate Cancer. *Int J Urol* 14:305-310, 2007.
 42. **Jordan, K. W.; Cheng, L. L.** NMR-Based Metabolomics Approach to Target Biomarkers for Human Prostate Cancer. *Expert Rev Proteomics* 4:389-400, 2007.
 43. **Jain, K. K.** Applications of Nanobiotechnology in Clinical Diagnostics. *Clin Chem* 53:2002-2009, 2007.
 44. **Lin, J. F.; Xu, J.; Tian, H. Y. y col.** Identification of Candidate Prostate Cancer Biomarkers in Prostate Needle Biopsy Specimens Using Proteomic Analysis. *Int J Cancer* 121:2596-2605, 2007.
 45. **McLerran, D.; Grizzle, W. E.; Feng, Z. y col.** Analytical Validation of Serum Proteomic Profiling for Diagnosis of Prostate Cancer: Sources of Sample Bias. *Clin Chem* 54:44-52, 2008.
 46. **Reynolds, M. A.; Kastury, K.; Groskopf, J. y col** Molecular Markers for Prostate Cancer. *Cancer Lett* 249:5-13, 2007.
 47. **Hoshii, T.; Nishiyama, T.; Toyabe, S. y col.** Evaluation of Magnetic Resonance Imaging-Based ProstateSpecific Antigen Density of the Prostate in the Diagnosis of Prostate Cancer. *Int J Urol* 14:305-310, 2007.
 48. **Jordan, K. W.; Cheng, L. L.** NMR-Based Metabolomics Approach to Target Biomarkers for Human Prostate Cancer. *Expert Rev Proteomics* 4:389-400, 2007.
 49. **Jain, K. K.** Applications of Nanobiotechnology in Clinical Diagnostics. *Clin Chem* 53:2002-2009, 2007.
 50. **Lin, J. F.; Xu, J.; Tian, H. Y. y col.** Identification of Candidate Prostate Cancer Biomarkers in Prostate Needle Biopsy Specimens Using Proteomic Analysis. *Int J Cancer* 121:2596-2605, 2007.

51. **McLerran, D.; Grizzle, W. E.; Feng, Z. y col.** Analytical Validation of Serum Proteomic Profiling for Diagnosis of Prostate Cancer: Sources of Sample Bias. *Clin Chem* 54:44-52, 2008.
 52. **Reynolds, M. A.; Kastury, K.; Groskopf, J. y col** Molecular Markers for Prostate Cancer. *Cancer Lett* 249:5-13, 2007.
-
-