Diferenciación neuroendocrina y marcadores de proliferación celular en adenocarcinoma de próstata en un grupo de casos con antígeno prostático específico normal *vs* elevado

Guillermo Feria-Bernal,[a]* Víctor Manuel García-González,[a] Víctor Figueroa-Granados,[a] Braulio Martínez-Benítez[b] y Norma Ofelia Uribe-Uribe[b]

[a]*Departamento de Urología y* [b]*Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F., México*

Recibido en su versión modificada: 03 de agosto de 2006

Aceptado: 04 de agosto de 2006

Resumen

Objetivo. *Investigar la población de células neuroendocrinas y sus características morfológicas en pacientes con cáncer de próstata y antígeno sérico normal* versus *antígeno sérico elevado.*

Material y métodos. *En 13 años se identificaron 372 casos de cáncer de próstata de los cuales 19 (5.1%) con antígeno sérico normal (Grupo I). Se seleccionaron 16 grupos controles con antígeno sérico elevado y características histopatológicas similares (Grupo II). Se evaluaron porcentaje de necrosis tumoral, invasión vascular y perineural, inmunohistoquímica: sinaptofisina, enolasa neuroespecífica, antígeno prostático específico, Ki-67 y p53.*

Resultados. *En el grupo I, se obtuvieron 61 % de casos positivos para antígeno tisular, 28.6 % sinaptofisina, 7.1 % para enolasa neuroespecífica, 50 % para p53 y 78.6 % para Ki-67. En el grupo II, los resultados fueron: sinaptofisina 13.3%, enolasa-neuroespecífica 26.6%, antígeno tisular 93%, p53 46.6% y Ki-67 66.7%. Con punto de corte de antígeno tisular expresado en < 80% de células neoplásicas, en el grupo I se encontraron 69.2% de casos, y en el grupo II 21.4% (p = 0.02).*

Conclusiones. *El único dato histológico que mostró diferencia significativa fue la expresión tisular de antígeno prostático específico en < 80% de las células neoplásicas en el grupo I. Se asoció el incremento de las células neuroendocrinas con el menor número de células productoras de antígeno tisular; esta situación podría ser más visible al estudiar un mayor número de pacientes con características semejantes.*

Palabras clave:
Antígeno prostático específico, diferenciación neuroendócrina, marcadores de proliferación

Summary

Objective. *Study the morphologic characteristics of neuroendocrine cells in prostate cancer with normal versus elevated prostate specific antigen (PSA).*

Materials and Methods. *372 cases of prostate cancer were identified during a 13 year period, of which 19 displayed normal PSA (group I). Sixteen controls with elevated PSA and similar histopathological characteristics (group II) were included. We studied the degree of tumor necrosis, vascular and perineural invasion. Synaptophysin (SP), neuron specific enolase (NSE), PSA, Ki-67 and p53 inmunoreactivity were also analyzed.*

Results. *Group I positive findings were 61% PSA, 28.6% SP, 7.1% NSE, 50% p53, and 78.6% Ki-67. Group II positive findings were 93% PSA, 13.3% SP, 26.6% NSE 46.6% p53, and 66.7% Ki-67. When we used a <80% cutoff point for PSA immunoreactivity in tumor cells , 69.2% of group I and 21.4% of group II were found.*

Conclusions. *The sole histopathological finding that showed statistical significance was the tissular expression of the specific prostatic antigen in 80% of neoplasic cells in group I. The increase of neuroendocrine cells was associated with a smaller number of tissular antigen producing cells, a finding that could be more apparent if we were to study a larger sample size.*

Key words:
Specific prostatic antigen, neuroendocrine differentiation, proliferation markers

Introducción

Las células epiteliales de la próstata son básales, epiteliales secretoras y neuroendocrinas (NE); éstas últimas están involucradas en el proceso de regulación del desarrollo prostático,[1] diferenciación y homeostasis de la actividad exócrina de la glándula mediante la liberación de diversas sustancias como serotonina, cromogranina- A, enolasa, etc;[2,3,4] son susceptibles de ser identificadas mediante tinciones especiales de inmunohistoquímica. Algunos autores han

* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Guillermo Feria Bernal. Jefe del Departamento de Urología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Col. Sección XVI, Deleg. Tlalpan, 14080 México D.F. Tel. (52 55) 5487 0900 ext. 2145, Fax: (52 55) 5485 4380. Correo electrónico: gferiab@yahoo.com.mx.

encontrado un mayor número de células NE en cáncer prostático (CaP),[5] mismo que suele incrementarse aún más en pacientes refractarios al tratamiento hormonal quizá como resultado de la selección clonal.[6] Cuando la célula tumoral prostática pierde sus características, hay reducción de los receptores hormonales y, en algunos casos, también de la producción del antígeno prostático específico (APE).

Por otro lado, existe un grupo de pacientes con CaP cuyo APE nunca se eleva, aún en estadios avanzados de la enfermedad.[4] La falta de producción de este marcador podría deberse a que corresponde a tipos histológicos muy indiferenciados con una posible sobrepoblación de células NE desde un inicio con una disminución importante de receptores androgénicos.[7]

El objetivo de nuestro estudio fue investigar la población de células NE, mediante marcadores específicos, y la proliferación celular en pacientes con CaP y APE normal comparado con otro grupo similar con APE elevado.

Material y métodos

Se realizó un estudio retrospectivo, controlado, ciego, descriptivo y comparativo con casos seleccionados de enero de 1987 a junio del 2000 en el INCMNSZ, periodo durante el cual se diagnosticaron 372 casos de CaP; de ellos, 19 (5.1%) presentaron APE sérico en niveles normales. Debido a que la detección del APE sérico está influenciada por el grado histológico de la lesión y por la edad del paciente, se buscaron controles pareados por grupo de edad y por la suma de Gleason pero con APE sérico elevado. De los archivos del departamento de Patología Quirúrgica del INCMNSZ se obtuvieron laminillas y bloques de parafina de 17 casos y 16 controles. De los casos con APE sérico bajo (Grupo I), 8 fueron obtenidos por biopsia con aguja delgada, 4 por prostatectomía radical y 5 por resección transuretral de próstata (RTUP). Mientras que de los controles (Grupo II) 6 fueron obtenidos por biopsia con aguja delgada, 7 por prostatectomía radical, 2 por RTUP y uno mediante biopsia por *trucut*. Las RTUP del Grupo I fueron efectuadas porque estos pacientes presentaban síndrome obstructivo bajo con APE en niveles normales.

El material disponible fue fijado con formol al 10%, procesado de forma convencional, embebido en parafina y teñido con hematoxilina y eosina. Un solo patólogo evaluó por cada caso el porcentaje de tumor en el espécimen, los patrones de Gleason primario y secundario y la suma de Gleason, el porcentaje de necrosis tumoral, la invasión vascular linfática y perineural.

En cuanto a las reacciones inmunohistoquímicas, se sabe que la cromogranina y la sinaptofisina han sido consideradas como marcadores panendocrinos. En la experiencia del laboratorio de inmunohistoquímica del INCMNSZ, los resultados obtenidos con el empleo de la sinaptofisina son más consistentes e intensos que los obtenidos con la cromogranina, por este motivo se prefirió trabajar con ésta primera. Se realizó inmunohistoquímica con el protocolo convencional, usando los siguientes anticuerpos: sinaptofisina (Dako, Denmark 1:75), enolasa neuronal específica (ENE) (Dako, Denmark 1:75), antígeno prostático específico (Dako, Denmark 1:50), Ki-67 (Dako, Denmark 1:75). También se empleó anticuerpo monoclonal de ratón anti-p53 humano (Dako, Denmark, clona DO-7 1:50), el anticuerpo detecta un epítope localizado en la región N-terminal que reacciona tanto con p53 nativa como con la mutada. Posteriormente para cada marcador, se cuantificó en el tumor la proporción de células neoplásicas positivas.

El análisis estadístico se realizó con un software comercial. Usamos como medidas de tendencia central: promedio, moda y mediana para las variables con distribución paramétrica y no paramétrica, y como medidas de dispersión: desviación estándar para variables paramétricas e intervalo mínimo-máximo para las no paramétricas. La comparación entre promedios se hizo mediante la prueba *t* student, y la comparación entre proporciones, mediante X^2 y la prueba exacta de Fisher (con probabilidad de dos colas). Para los valores esperados mayores y menores de 5, se consideró siempre como significativo un valor de $p < 0.05$.

Resultados

El grupo I consta de 19 pacientes con una edad promedio de 65.7 años. El APE sérico se situó en niveles normales con 12 pacientes con nivel menor a 4 ng/ml y 7 con nivel superior a 4 ng/ml, pero sin rebasar 6 ng/ml; el nivel promedio de APE sérico fue de 3.5 ng/ml, la mediana y la moda de la suma de Gleason fue de 6 (min: 3, max: 10). El grupo II se integra con 16 pacientes con una edad promedio de 65.5 años, con un nivel promedio de APE sérico de 21.3 ng/ml y con mediana y moda de suma de Gleason de 6 (minima 4 y máxima 9) (Cuadro I).

De los 19 casos del grupo I, sólo estuvo disponible para el estudio el material histopatológico de 17 (8 biopsias, 5 RTUP y 4 prostatectomías radicales). Del grupo II se encontraron 16 especimenes (7 biopsias, 4 RTUP y 7 prostatectomías radicales).

Se analizó el factor tiempo sobre la expresión de marcadores inmunohistoquímicos analizando 2 grupos, uno comprendido en el periodo 1988-1996 y el otro en el periodo 1997-2003; no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de CaP con APE normal o elevado, ni en la expresión de sinaptofisina, p53 y Ki-67; sin embargo, hubo diferencia en la expresión de enolasa neuronal específica. Esta diferencia no es atribuible a la fijación de los tejidos, dado que no hubo expresión en otros tejidos que fueron positivos para otros anticuerpos y tampoco es atribuible al anticuerpo, dado que se empleó el mismo en todos los casos.

En el cuadro II, se observan los resultados histopatológicos de ambos grupos y su significancia estadística.

El grupo I presentó un porcentaje promedio de área afectada por la neoplasia de 29.7% distribuidos de la siguiente manera: 4 casos (25.0%) con necrosis en promedio en 12.5% del tejido (10-20%), 5 casos (29.4%) con invasión perineural y 2 casos (11.8%) con invasión vascular. En cuanto

Cuadro I. Datos epidemiológicos de pacientes con carcinoma de próstata y APE sérico normal o elevado

	APE normal	APE elevado	p
Edad, años	65.7	65.5	NS
Mediana de la suma de Gleason	6	6	NS
(mínima-máxima)	(3-10)	(4-9)	
Promedio APE sérico	3.5 ng/ml	21.3 ng/ml	

a los resultados de inmunohistoquímica, la inmunorreacción para APE tisular presentó solamente 8 casos positivos (47.0%) con un porcentaje de expresión celular promedio de 41.2% (0-100%), la expresión de sinaptofisina se detectó en 4 casos (28.6%); un caso fue positivo para ENE (7.1%); la expresión de p53 se detectó en 7 casos (50.0%); finalmente para Ki-67 se encontró positivo en 11 casos (78.6%).

El grupo II presentó un porcentaje de área afectada por la neoplasia en de 25.9% en promedio; con necrosis en 2 casos (12.5%) en promedio en 27.5% del tejido (5-50%); 4 casos con invasión perineural (25.0%), sin identificar invasión vascular en algún caso. En cuanto a la expresión de sinaptofisina 2 casos fueron positivos (13.3%) la positividad promedio fue de 1.3% (0-19.03%); para la ENE fueron positivos 4 casos (26.6%) con promedio de positividad de 8.5% (0-90%); la inmunolocalización para APE tisular mostró 13 casos positivos (93.0%) y promedio de positividad celular de 83.6% (0-100%); p53 con 7 casos positivos (46.6%); y finalmente para Ki-67 se detectó en 10 casos (66.7%) y promedio de positividad celular del 3.5% (0-19.14%).
Cuando se hizo el punto de corte de APE tisular expresado en <80% de células neoplásicas (seleccionado por curva ROC), en el grupo I se encontraron 69.2% casos, y en el grupo II 21.4% (p = 0.02).

Cuadro II. Características histopatológicos analizados, en pacientes con carcinoma de próstata y APE sérico normal o elevado

Porcentaje	APE normal	APE elevado	p
Área afectada	29.7%	25.9%	NS
Necrosis	25.0%	12.5%	0.3*
Invasión perineural	29.4%	25.0%	0.5*
Invasión vascular	11.8%	0.0%	0.25*
Sinaptofisina	28.6%	13.3%	0.3*
ENE	7.1%	26.6%	0.32*
Ki-67	78.6%	66.7%	0.4*
P53	50.0%	46.6%	0.85**
APE tisular	61.5%	93.0%	0.07*
APE tisular <80% de células positivas	69.2%	21.4%	0.02*

* Prueba exacta de Fisher a dos colas, ** Xi^2
Los resultados de inmunohistoquímica fueron expresados de manera binomial y corresponden a la proporción de casos con expresión de la proteína.

Discusión

Al igual que la serie que se presenta, se han informado otras con 5 y 25% de casos con CaP que muestran APE sérico en niveles normales. Este grupo de pacientes representa un reto para su identificación, puesto que sólo los hallazgos anormales o sospechosos al tacto rectal son capaces de sugerir una biopsia, o bien se diagnostican incidentalmente luego de una cirugía realizada para corregir síntomas obstructivos secundarios a crecimiento prostático. Desafortunadamente algunos de estos pacientes son detectados en estadios avanzados de su enfermedad y, por ende, con pocas probabilidades de ser candidatos para un tratamiento de tipo curativo.[8]

El presente estudio se diseñó para probar la hipótesis de que el incremento de células neuroendocrinas explicaría la presencia de APE sérico normal. La fuente de células neuroendocrinas en CaP no se ha definido clínicamente.[9] En estudios experimentales se han transformado células de carcinoma de próstata en células *similares* a las NE cuando se estimulan con análogos de AMP cíclico, deprivación hormonal y se someten a exposición a altas concentraciones de interleucina-6.[6] Existen datos que sugieren que las células epiteliales prostáticas secretoras, basales y neuroendócrinas provienen de células endodérmicas *troncales* o *madre* pluripotenciales.[10] Su significado clínico no es totalmente claro; de hecho el 50% de los cánceres de próstata contienen células neuroendócrinas, lo que supone un mayor grado de agresividad. Aun cuando se dice que la diferenciación neuroendocrina se asocia con mayor indiferenciación celular y peor pronóstico, hay quienes no encuentran correlación entre su presencia y el grado tumoral.[3,9] En esta serie, los casos que mostraron células neoplásicas con diferenciación neuroendocrina, independiente de la expresión tisular o la concentración sérica de APE, presentaron sumas de Gleason de riesgo bajo o intermedio (suma de Gleason: 3, 5, 6, 6, 7, 7) (Figura 1).

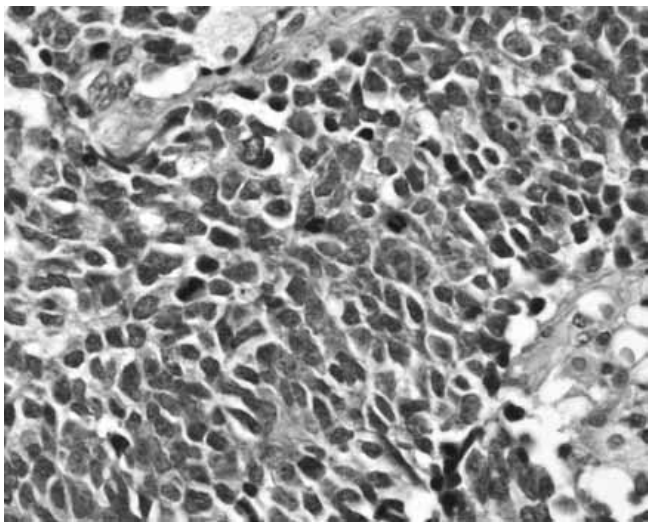

Figura 1. Carcinoma de próstata poco diferenciado, las células neoplásicas tienen núcleo grande hipercromático, con cromatina homogénea, finamente granular, nucléolo poco aparente y citoplasma es escaso. Hay abundantes mitosis.

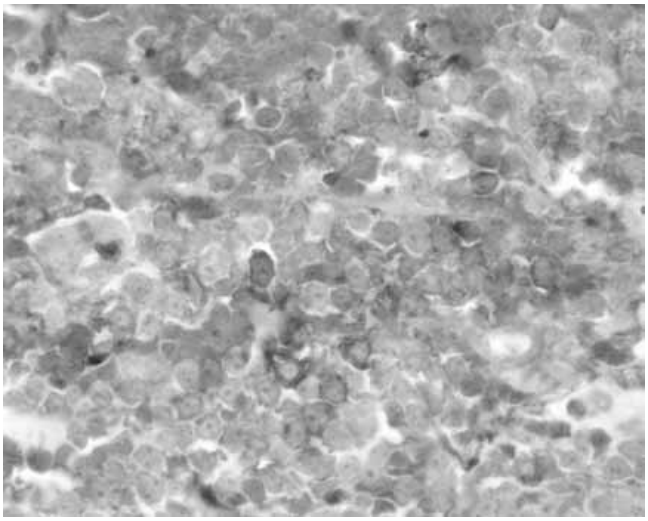

Figura 2. Reacción de inmunoperoxidasa dirigida en contra de sinaptofisina, en este campo aproximadamente 50% de las células muestra positividad (café tabaco) en las células neoplásicas.

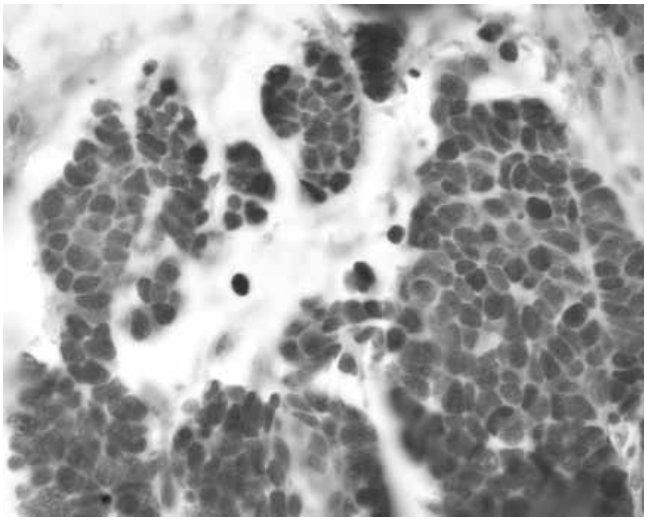

Figura 3. Reacción de inmunoperoxidasa que muestra positividad nuclear para p53 en casi la totalidad de las células neoplásicas.

Se ha informado que la población total de células NE aumenta coordinadamente con la progresión tumoral al estado hormona-resistente, quizá porque estas células funcionan como proveedores de factores estimulantes paracrinos que aceleran el desarrollo y la progresión de las células tumorales hacia la selección clonal y un estado andrógeno independiente. En este trabajo, se detectaron 6 casos con presencia de células positivas para sinaptofisina (Figura 2). A pesar de que la mayoría (4 de 14) se encontró en el grupo de pacientes con APE normal (28.6%) y sólo 2 casos en el grupo con APE elevado (13.3%), esta diferencia no es estadísticamente significativa. Aunque se muestra tendencia a una mayor expresión de esta tinción entre aquéllos con APE sérico normal.

No obstante la tendencia de registrar casos de CaP con células neuroendocrinas que contribuyen a explicar un APE sérico normal, existen otros casos con APE normal sin diferenciación neuroendocrina. Por este motivo y dado que hay pocos trabajos que comparen la expresión tisular de APE contra la concentración sérica, decidimos estudiar esta relación también. Como se muestra en el cuadro II, existen más casos sin expresión tisular de APE en el grupo I con una tendencia a ser significativo. Sin embargo, cuando analizamos la proporción de células que expresaban este marcador y fijamos el punto de corte a 80%, encontramos diferencia estadísticamente significativa entre los grupos I (69.2 %) y II (21.4 %, $p = 0.02$). Por lo que concluimos que, en menos del 80% de las células, la expresión tisular de APE contribuye a que no se manifieste elevación de APE sérico. Varios investigadores señalan que el nivel sérico de APE depende del volumen del carcinoma, del peso de la próstata y del grado histológico. En el presente trabajo, se pareó de acuerdo con la edad y con el grado histológico para eliminar esta variable. Debido a la diversidad de métodos mediante los cuales se obtuvo el tejido prostático, es difícil el análisis de la relación del APE sérico con el peso de la próstata y el volumen del carcinoma aunque se haya calculado el porcentaje de tejidos afectados sin mostrar diferencia entre los grupos. Sin embargo, al separar los CaP de acuerdo con el punto de corte de 80% de células neoplásicas positivas a APE, se encontraron 11 casos con expresión de menos de 80% con un promedio de área afectada del 42.27% (10-90%), lo que sugiere que una producción baja de APE induce un diagnóstico tardío de CaP. Por ello los pacientes con este tipo de neoplasia se diagnostican en una etapa clínico-patológica más avanzada. De igual manera, se encontraron 15 casos con expresión tisular mayor de 80%, con un promedio de área afectada de 18.3% (5-70%), lo cual estaría acorde con el hecho de que el volumen de la neoplasia es una variable que influye sobre la detección de APE sérico.

Al comparar los hallazgos histológicos (Cuadro II), observamos la presencia de necrosis (23.5% *vs.* 12.5%), y que la invasión vascular (23.5% *vs.* 0.0%) predomina en el grupo de pacientes con APE normal. Estos resultados sugieren que, en el grupo I, los tumores son detectados en etapas clínicas más avanzadas o bien tienen un comportamiento biológico más agresivo. En relación con la invasión perineural no hubo diferencias entre ambos grupos.

El marcador de proliferación celular Ki-67, se encuentra presente en las células en fase GI, S y G2M, pero nunca en fase G0 y su índice de marcaje tiene significancia pronóstica,[7] como lo tiene también la sobreexpresión de p53; ambos son poderosos factores pronósticos, asociados con una pobre sobrevivencia (Figuras 3 y 4).[11-13] En nuestro estudio, estos marcadores (Cuadro II) no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos; esto puede ser el resultado del pareamiento de acuerdo con la suma de Gleason.

La sinaptofisina es un marcador específico para células neuroendócrinas así como la enolasa neuroespecífica. Esta última de acuerdo con algunos trabajos realizados por

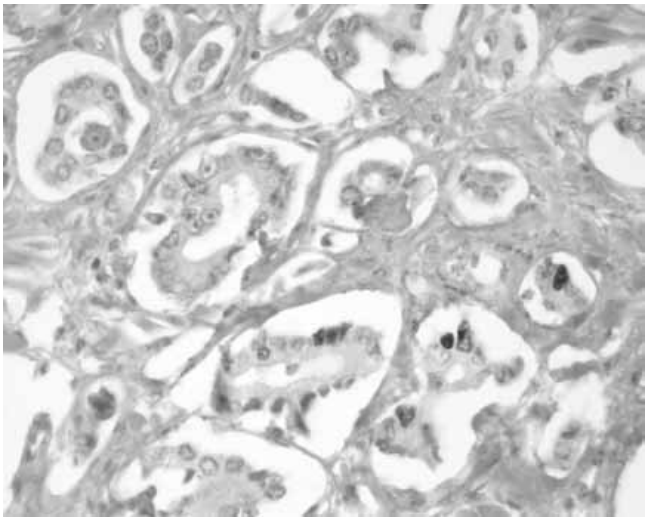

Figura 4. Inmunorreacción para Ki-67 que muestra positividad focal en los núcleos de células neoplásicas.

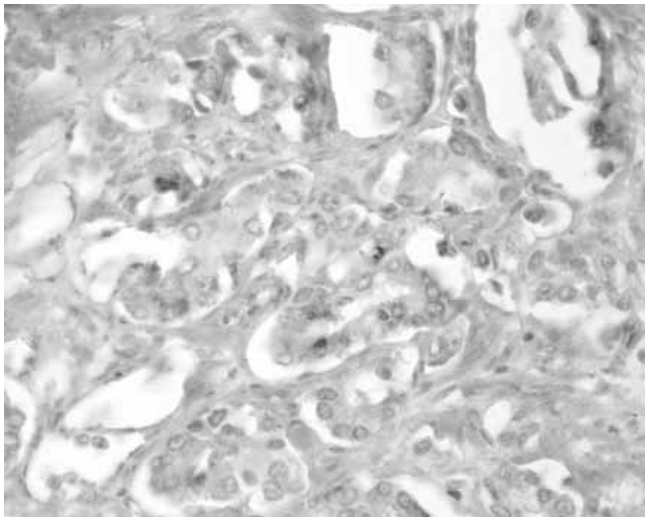

Figura 5. Inmunomarcación para enolasa neuroespecífica que muestra positividad débil citoplasmática en las células neoplásicas.

Berruti y cols.[3] ha llegado a positivisarse en tejidos con ausencia de células neuroendócrinas de tal suerte que su especificidad no es muy alta. Al analizar los resultados de las tinciones de inmunohistoquímica, observamos que la sinaptofisina fue positiva en un mayor número de casos en el grupo I mientras que, en forma contradictoria, la enolasa neuroespecífica lo fue para el grupo II (Figura 5). Dado los antecedentes de menor especificidad de la enolasa neuroespecífica, estos hallazgos se podrían explicar con base en los estudios del grupo de Berruti.[14-17]

Existen algunos otros elementos que posiblemente estén impactando los resultados que hemos obtenido. Dentro del grupo I, cinco pacientes tenían antígenos prostáticos específicos altos, pero *normales* ajustados con base en su edad. Esto no es aceptado en la actualidad, ya que de acuerdo con los estudios realizados por Catalona y su grupo, los niveles máximos de antígeno prostático sérico normal tienen tendencia a reducirse, aún por debajo de 4 ng/ml.[19,18]

La obtención de tejido prostático en nuestros dos grupos de pacientes fue diversa. Esto puede influir en los resultados histopatológicos en un grado realmente impredecible, particularmente cuando sabemos que, por ejemplo, la suma de Gleason puede ser diferente entre la que se reporta después de una biopsia y después del análisis del espécimen quirúrgico completo en un mismo paciente. Por último, nuestra serie es muy pequeña; analizar más adelante un mayor número de casos podría poner en evidencia una mayor tendencia a la diferenciación neuroendócrina en este tipo de tumores. Por lo tanto se requiere continuar con la investigación para poder obtener resultados más sólidos.

Conclusiones

En este trabajo se identificó la tendencia de que la población de células neuroendocrinas se asocia a una disminución en el número de células productoras de antígeno prostático específico, situación que podría ser más evidente al estudiar un número mayor de pacientes con estas características.

Al analizar en este trabajo las diferencias entre casos y controles, el único dato histológico que mostró diferencia significativa fue la expresión tisular de APE en menos del 80% de las células neoplásicas; este tipo de CaP con detección disminuida de APE tisular se presentó con mayor frecuencia con APE sérico normal y, con una mayor área tumoral (42.27%) en comparación con los CaP con detección de APE tisular en más del 80% de las células neoplásicas (área tumoral: 18.3%).

Como se ha postulado por otros autores, los niveles séricos de APE pueden ser modificados por otras variables independientes del grado de diferenciación o volumen tumoral; estas variables son difíciles de controlar en estudios clínicos. Por ejemplo, la discrepancia entre la expresión tisular de APE y los niveles séricos puede que se deba a una diferencia entre la producción de esta proteína por las células neoplásicas y la secreción de la misma. Las alteraciones estructurales de las células neoplásicas podrían alterar la difusión de APE al espacio extracelular y a los vasos sanguíneos, o bien, podrían producir una isoforma de APE que fuera estructuralmente diferente y, por ende, dificultaría su detección por métodos convencionales de laboratorio o con inmunoperoxidasa.[20]

Referencias

1. **Aihara, M, Scardino P, Truong T, Wheeler T, Goad J, Yang G, et al.** The frequency of apoptosis correlates with the prognosis of Gleason Garde 3 adenocarcinoma of the prostate. Cancer 1995;75(2):522-529.
2. **Becker C, Piironen T, Pettersson K, Björk T, Wojno K, Oesterling J, et al.** Discrimination of men with prostate cancer from those with benign disease by measurements of human glandular kallikrein 2 (HK2) in serum. J Urol 2000;163:311-316.
3. **Berruti A, Dogliotti L, Mosca A, Bellina M, Mari M, Torta M, et al.** Circulating neuroendocrine markers in patients with prostate carcinoma. Cancer 2000;88(11):2590-2597.

4. **Cherry J, Mordente J, Chapman J, Choudhury M, Tazaki H, Mallouh C, et al.** Analysis of Cathepsin D forms and their clinical implications in human prostate cancer. J Urol 1998;160(6):2223-2228.
5. **Bostwick D, Qian J, Pacelli A, Zincke H, Blute M, Bergstralh E, et al.** Neuroendocrine expression in node positive prostate cancer: Correlation with systemic progression and patient survival. J Urol 2002;168:1204-1211.
6. **Burchardt T, Burchardt M, Chen MW, Cao Y, De la Taille A, Shabsigh a, et al.** Transdifferentiation of prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in vitro and in vivo. J Urol 1999;162:1800-1805.
7. **Casella R, Bubendorf L, Sauter G, Moch H, Mihatsch M and Gasser T.** Focal neuroendocrine differentiation lacks prognostic significance in prostate core needle biopsies. J Urol 1998;160(2):406-410.
8. **Dénes F, Brito A, Dos-Santos A.** Subcutaneous and testicular metastasis from prostatic adenocarcinoma with neuroendocrine differentiation. Braz J Urol 2001;27(1):52-54.
9. **di Sant'Agnese PA.** Divergent neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. Semin Diagn Pathol 2000;17(2):149-161.
10. **Gohji K, Kitazawa S, Tamada H, Katsuoka Y and Nakajima M.** Expression of endothelin receptor a associated with prostate cancer progression. J Urol 2001;165:1033-1036.
11. **Isola J, Auvinen A, Poutiainen M, Kakkola L, Järvinen T, Määttänen L, et al.** Predictors of biological aggressiveness of prostate specific antigen screening detected prostate cancer. J Urol 2001;165:1569-1574.
12. **Isshiki S, Akakura K, Komiya A, Suzuki H, Kamiya N and Ito H.** Chromogranin a concentration as a serum marker to predict prognosis after endocrine therapy for prostate cancer. J Urol 2002(2);167:512-515.
13. **Kadmon D.** Beyond prostate specific antigen – Markers for prostate cancer for the 21st century. J Urol 2000;163:828.
14. **Karazanashvili G and Per-Anders Abrahamsson.** Prostate specific antigen and human glandular kallikrein 2 in early detection of prostate cancer. J Urol 2003;169:445-457.
15. **Lehrer S, Diamond E, Stone N, Droller M and Stock R.** Serum triiodothyronine is increased in men with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. J Urol 2002;168:2431-2433.
16. **Wehbi NK, Dugger A, Bonner R, Pitha J, Hurst R and Hemstreet G III.** Pan-Cadherin as a high level phenotypic biomarker for prostate cancer. J Urol 2002;167:2215-2221.
17. **Yashi M, Muraishi O, Tokue A.** Prostatic small-cell neuroendocrine carcinoma with disease progression monitored by measurement of serum progastrin-releasing peptide. BJU Int 2001;88(3):306-308.
18. **Yang, G, Stapleton A, Wheeler T, Truog L, Timmer T, Scaedino P, et al.** Clustered p53 immunostaining: a novel pattern associated with prostate cancer progression. Clin Cancer Research 1996;2:399-401.
19. **Epstein J.** Pathology of Prostatic Neoplasia. In: Campbell´s Urology, 8ed.. Edited by P. C. Walsh, A.B. Retik, E.D. Vaughan and A.J. Wein. Philadelphia: W.B. Saunders Co., vol. 4, capt 86, pp. 3025-3037, 2002.
20. **Weir EG, Partin AW, Epstein JI.** Correlation of serum prostate specific antigen and quantitative immunohistochemistry. J Urol 2000;163:1739-1742.