



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Valor de la Testosterona Libre en el Diagnóstico y Seguimiento del Cáncer de Próstata

Lucas Regis Plácido

.

TESIS DOCTORAL UAB / 2016

Director y Tutor de la Tesis

Dr. Juan Morote Robles

Tribunal

Dr. Manel Armengol Carrasco

Dr. Agustín Franco De Castro

Dr. Josep Comet Batlle

Programa de Doctorat de Cirurgia i Ciències Morfològiques

AGRADECIMIENTOS

*“Quero a certeza dos loucos que brilham. Pois se o louco persistir na sua loucura,
acabará sábio”.*

Raul Seixas, 1977.

Depositar la tesis doctoral reafirma la decisión tomada en los pasillos del Hospital Universitario Professor Edgard Santos de la Facultad de Medicina de Salvador-Bahia, en el año 2008: emigrar, un reto profesional y personal.

A mi madre, que despertó en mí la pasión por la medicina, por su comprensión y amor, así como por ser una eterna referencia de persistencia, trabajo y fuerza. A mi padre, por el ejemplo y los sólidos principios que me ha transmitido. A mis hermanas, por el cariño inagotable, la preocupación y el apoyo incondicional. Son pilares que hacen mi camino más certero. A la Dra. Gildete Carvalho, mi madrina, mi primer ejemplo hacia los estudios de doctorado, que me permitió entender desde joven que estudiar sería para toda la vida.

A mi compañera, mi mujer y eterna *namorada*, Paula, cómplice y continúa incentivadora de mis proyectos y con quien comparto la inquietud motriz del aprendizaje, fundamental para vivir los desafíos con placer e ilusión.

En el ámbito profesional, al Dr. Juan Morote, director de mi tesis, por haber confiado. Al *staff* del Servicio de Urología del Hospital Vall d’ Hebron de Barcelona. A los residentes, que hacen que las mismas actividades diarias tengan mucho más sentido cuando se comparten con amigos.

ABREVIACIONES

ARN: ácidoribonucleico

AUC: *area under the curve*

DHT: dihidro-testosterona

DCE: *dynamic contrast enhancement*

DWI: *diffusion-weighted imaging*

EAU: *European Association of Urology*

ERSPC: *European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer*

FDA: *Food and Drug Administration*

IC95%: intervalo de confianza de 95%

LH: hormona luteinizante

LHRH: hormona liberadora de la hormona luteinizante

PCA3: *prostate cancer antigen 3*

phi: *Prostate Health Index*

PSA: antígeno prostático específico

PLESS: *Proscar Long-term Efficacy and Safety Study*

PLCO: *Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian*

QUALYs: calidad de vida ajustada a los años de vida ganados

RIA: radioinmunoanálisis

RNM: resonancia magnética nuclear

RR: riesgo relativo

SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales

SLRC: supervivencia libre de resistencia a la castración

USPSTF: *US Preventive Services Task Force*

RESUMEN

Desde que Huggins y Hodges en 1941 describieran la hormono dependencia del cáncer de próstata, la elevación de los niveles de testosterona en suero ha sido relacionada con la carcinogénesis prostática. Sin embargo, el papel de la testosterona en la neoplasia de la próstata es controvertida. La testosterona en suero se encuentra unida mayoritariamente a la hormona transportadora de esteroides sexuales y a la albúmina, y solamente, entre un 1 y 2% circula en forma de testosterona libre, isoforma biológicamente activa. Los pacientes con cáncer de próstata avanzado sometidos a terapia de deprivación androgénica presentan mayor intervalo libre de progresión y supervivencia si mantienen bajos niveles de testosterona. La castración ha sido definida históricamente como testosterona total inferior a 50 ng/dL, aunque los niveles óptimos de supresión están por definir. Actualmente las guías de práctica clínica recomiendan la determinación de la testosterona total sérica para evaluar la eficacia de la terapia de deprivación androgénica y, además, para diagnosticar la resistencia a la castración. Dado que la testosterona libre es la isoforma biológicamente activa de la hormona, creemos que se correlaciona mejor con los niveles intraprostáticos que la testosterona total.

El objetivo global de nuestro proyecto de tesis fue comparar la testosterona total y libre en el I. diagnóstico del cáncer de próstata; II. predicción de la agresividad tumoral; y III. control de los pacientes sometidos a terapia de deprivación androgénica, como predictor de supervivencia libre de resistencia a la castración.

Se trata de un estudio realizado en dos grupos de pacientes que representan momentos distintos de la historia natural de la enfermedad: la base de datos 1 formada por 3364 pacientes con sospecha clínica de cáncer de próstata por elevación del PSA y/o tacto rectal anormal, con recogida prospectiva de los datos clínico-demográficos (edad, índice de masa corporal, PSA total y libre, tacto rectal, volumen prostático, resultado de la biopsia, suma Gleason, estadiaje patológico [TNM 2002]) y perfil hormonal (testosterona total y testosterona libre). La base de datos 2 compuesta por 126 pacientes con diagnóstico histológico de cáncer de próstata avanzado sometidos a terapia de deprivación androgénica con agonista de la LHRH, con recogida retrospectiva de los datos clínico-demográficos y perfil hormonal.

La intervención realizada en nuestro estudio fue la determinación sérica de la testosterona total mediante método enzimático competitivo de quimioluminiscencia con límite inferior de detección de 10,0 ng/dL (*Immulite 2500 automated analyzer, DPC Inc., Los Angeles, CA, USA*) y de testosterona libre mediante método de radioinmunoanálisis con límite inferior de detección de 0,05 pg/mL (*DPC Inc., Los Angeles, CA, USA*). Los

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

objetivos principales fueron establecer la relación de la testosterona total y libre con la detección de cáncer de próstata y la predicción de su agresividad (base de datos 1); y analizar el valor predictivo de los niveles de testosterona total y testosterona libre en la supervivencia libre de resistencia a castración en pacientes sometidos a deprivación androgénica, así como establecer el menor nivel con impacto clínico (base de datos 2).

Se concluye que I. niveles bajos de testosterona sérica total y de testosterona libre incrementan el riesgo de detección de cáncer de próstata; II. Ninguno de los niveles de testosterona total o testosterona libre se asociaron con la agresividad tumoral; III. la testosterona sérica libre determinada a los 6 meses de deprivación androgénica fue un predictor independiente de supervivencia libre de resistencia a la castración en pacientes no diseminados, mientras que la testosterona total no lo fue. El menor nivel de testosterona libre con significado clínico fue 1,7 pg/dL.

ABSTRACT

Since Huggins and Hodges published the prostate cancer hormone dependence theory in 1941, high levels of serum testosterone have been associated with the prostatic carcinogenesis. However, there is a lack of knowledge about the real role of testosterone in the prostatic neoplasm. Serum testosterone is mainly bounded with sex hormone binding globulin and albumin and only 1-2% is found as free testosterone, the biologically active hormone isoform. Advanced prostate cancer patients under androgen deprivation therapy have long overall survival and survival free of progression rates when testosterone is kept in low levels. Historically, castration has been defined as total testosterone lower than 50 ng/dL, although optimal degree of testosterone suppression following castration remains in question. Current guidelines recommend serum testosterone determinations to evaluate the androgen deprivation therapy efficacy and, furthermore, to diagnose castration resistance status. Because free testosterone is the active isoform of serum testosterone, we believe that it correlates better with intraprostatic environment than total testosterone.

The main objective of our thesis project was to compare total and free testosterone in the I. prostate cancer diagnose; II. tumor aggressiveness prediction; and III. control of patients under androgen deprivation therapy as a survival free of castration resistance predictor.

Our study was performed in two groups of patients that represent different moments of the natural history of the disease. 3364 men under prostate cancer suspicious due to rising PSA and/or abnormal digital rectal examination (DRE) integrated the prospective collected database 1. 126 patients under androgen deprivation therapy with LHRH agonist due to advanced prostate cancer histologically diagnosed integrated the retrospective collected database 2. Both databases included clinical-demographic data (age, BMI, total and free PSA, DRE, prostatic volume, biopsy result, Gleason score, pathologic stage [TNM 2002]) and hormone profile (total and free testosterone).

The intervention performed was serum total testosterone measurement by competitive enzymatic chemiluminiscent assay with lower level of detection of 10.0 ng/dL (*Immulite 2500 automated analyzer, DPC Inc., Los Angeles, CA, USA*) and serum free testosterone measurement by radioimmunoanalysis assay with lower limit of detection of 0.05 pg/mL (*DPC Inc., Los Angeles, CA, USA*). Main endpoints were determine the relation between total and free testosterone and prostate cancer detection and its aggressiveness (database 1); and analyze total and free testosterone predictive values in

survival free of castration resistance in order to establish the lower threshold with clinical impact in patients under androgen deprivation therapy (database 2).

We conclude that I. low levels of total and free testosterone increment the risk of prostate cancer detection, II. no free or total testosterone levels showed any association with tumor aggressiveness; III. serum free testosterone determined at 6 months of androgen deprivation therapy was an independent predictor of survival free of castration resistance in no metastatic patients, while total testosterone wasn't. The lower free testosterone threshold with clinical impact was 1.7 pg/mL.

Agradecimientos	3
Abreviaciones	4
Resumen	5
Abstract	7

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	11
1.1	Epidemiología y diagnóstico del cáncer de próstata	11
1.2	Los andrógenos y el cáncer de próstata	23
2	HIPÓTESIS DE TRABAJO	29
3	OBJETIVOS	29
4	METODOLOGÍA	31
5	PARTE PRINCIPAL - CUERPO DE LA TESIS	33
	1. Behavior of total and free serum testosterone as a predictor for the risk of prostate cancer and its aggressiveness.	
	2. Determined Free Serum Testosterone is Better than Total Testosterone as a Predictor of Prostate Cancer Risk.	
	3. Measurement of serum testosterone during androgenic suppression in patients with prostate cancer: A systematic review	
	4. Free testosterone: a better surrogate than total testosterone to predict survival free of castration resistance.	
6	DISCUSIÓN	93

7	CONCLUSIONES	97
8	BIBLIOGRAFÍA	99

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología y diagnóstico del cáncer de próstata

El cáncer de próstata es el tumor sólido más frecuentemente diagnosticado entre los varones de los países industrializados. A nivel mundial, se estiman 1.111.700 nuevos casos diagnosticados y 307.500 defunciones decurrentes de este tumor, haciéndolo la segunda neoplasia más diagnosticada entre los varones y la quinta causa de mortalidad de origen neoplásica (Torre *et al.*, 2015). En los Estados Unidos, el cáncer de próstata es el cáncer visceral más detectado en hombres y se estima 220.800 nuevos casos diagnosticados en 2015, un 26% de todos los cánceres detectados, además de 27.540 muertes secundarias (Siegel *et al.*, 2015). En Europa se estima una incidencia de 59,3 casos por cada 100.000 hombres y constituye el 15% de las neoplasias masculinas (Center *et al.*, 2012). La incidencia es mayor en el norte y oeste del continente, mientras que las tasas en el este y sur de Europa han presentado un crecimiento continuo en los últimos años (Arnold *et al.*, 2015; Torre *et al.*, 2015), Figura 1. En 2013, Cózar JM *et al.* publicaron un estudio epidemiológico con el objetivo de estimar la incidencia del cáncer de próstata en España y describir el perfil clínico de los pacientes diagnosticados (Cózar *et al.*, 2013). Fueron diagnosticados 4.087 nuevos casos, correspondiendo el 21.8% de la población masculina española para el año analizado. La tasa de incidencia de cáncer de próstata estimada estandarizada por edad fue de 82,27 casos por 100.000 hombres. En Cataluña la tasa estimada fue de 85,70, quedando detrás de la región de Madrid con una tasa de 92,29 nuevos casos y superando la tasa andaluza de 70,38 por 100.000 hombres (Cózar *et al.*, 2013).

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

Figura 1. Incidencia del cáncer de próstata y tasas de mortalidad por región del mundo.

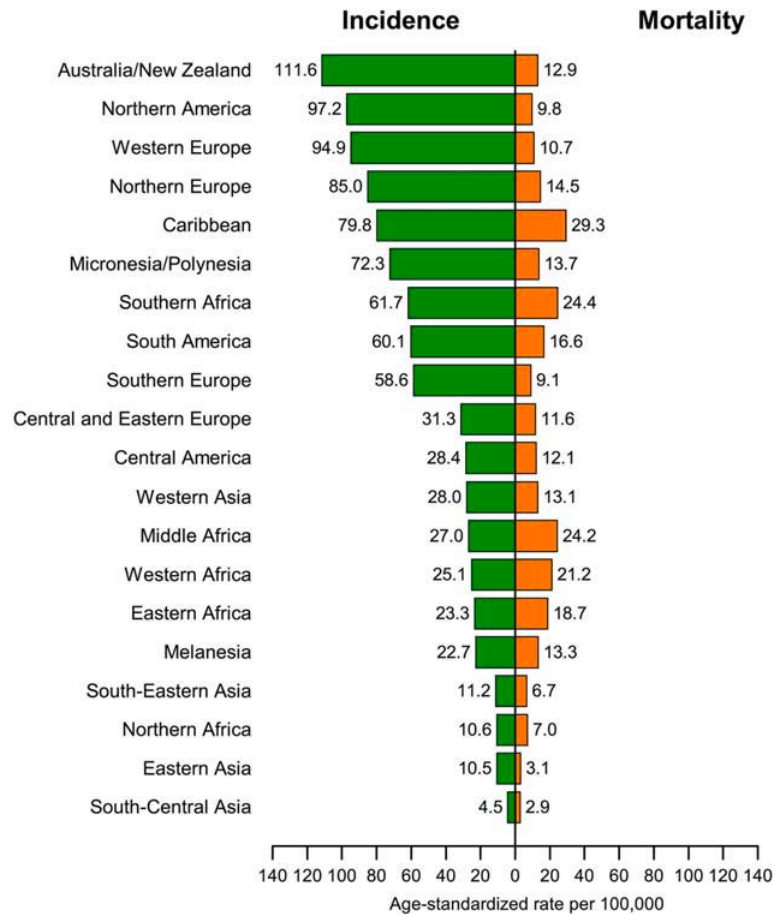


Figura extraída de: Torre, LA; Bray, F; Siegel, R; et al. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2015; 65: 87-108 (Torre *et al.*, 2015).

Distintos factores compiten a la hora de influenciar en el desenlace del cáncer de próstata, determinando de esta manera la calidad de vida y supervivencia de los pacientes. La extensión del tumor en el momento del diagnóstico es el principal factor que se relaciona con la supervivencia (Ferlay *et al.*, 2015). Por lo tanto, el momento de detección de la enfermedad en su historia natural cobra protagonismo en la evolución clínica. En este ámbito, un programa de cribado y optimización del tratamiento podría reducir la morbimortalidad del cáncer de próstata.

El cáncer de próstata es un enfermedad silente hasta fases tardías de su evolución. Los síntomas que pueden generar el desarrollo de esta neoplasia están relacionados a la afectación de estructuras adyacentes a la próstata o al compromiso del organismo a distancia. En el primer caso, la invasión de la uretra puede desencadenar síntomas del tracto urinario inferior obstructivos y/o irritativos; el paciente puede presentar hemospermia si el tumor afecta los ductos eyaculadores; si la extensión local alcanza los

nervios pélvicos, el paciente puede presentar disfunción eréctil o dolor pélvico/perineal. En el caso de diseminación a distancia, el paciente puede desarrollar complicaciones secundarias a la compresión ganglionar del tracto urinario superior o drenaje linfático de las extremidades inferiores, así como dolor óseo o alteraciones de funciones orgánicas vitales en el caso de diseminación hematogénica (Wein and Peters, 2016). Sin embargo, en absoluto la sintomatología constituye el pilar orientativo en la detección del cáncer de próstata. Los factores que determinan el riesgo de desarrollar el cáncer de próstata no han sido completamente elucidados, sin embargo existen tres factores establecidos: el aumento de la edad, el origen étnico y la herencia genética (Heidenreich *et al.*, 2014). Si un familiar presenta cáncer de próstata, el riesgo de desarrollar la enfermedad es el doble. En caso de presentar dos o más familiares afectados, el riesgo sube de 5 a 11 veces (Jansson *et al.*, 2012; Hemminki, 2012). El tacto rectal es la parte más importante de la exploración física en el cáncer de próstata, llegando a presentar una sensibilidad del 52% y una especificidad del 81% según estudios publicados en la década de 90 (Partin *et al.*, 1993). Entre los hallazgos anómalos, se destacan la presencia de nódulos, asimetrías y endurecimientos. Su relevancia es aun más notable al considerar que un 85% de los cánceres crece periféricamente donde pueden ser detectados con el tacto rectal (Epstein, 2002). Aunque la mayoría de los tumores detectados por tacto rectal son anatómicos patológicamente avanzados (Chodak *et al.*, 1989), su práctica comprobadamente reduce la morbilidad del cáncer de próstata independiente de la edad del diagnóstico, además el poder de predicción es mejor cuando asociado con la determinación del antígeno prostático específico (PSA por sus siglas en inglés) (Catalona *et al.*, 1991).

El PSA es una glicoproteína producidas por las células epiteliales prostáticas, que tiene un peso molecular de 33 kilodaltons (Partin AW, 2016). Su elevación en el plasma en los pacientes con cáncer de próstata es debida a la combinación del aumento en su producción y del descenso en su eliminación. Sin embargo, condiciones benignas pueden promover la elevación de sus valores plasmáticos, especialmente la hiperplasia benigna de la próstata, la prostatitis (Kawakami *et al.*, 2004) y la eyaculación (Tchetgen *et al.*, 1996). Además las manipulaciones urológicas también pueden aumentar los niveles séricos de PSA: el tacto rectal eleva mínimamente el PSA, pudiéndose realizar las mediciones del mismo inmediatamente después de dicha exploración (Chybowski *et al.*, 1992); la retención aguda de orina puede elevar el PSA, aunque de forma transitoria, por ello se recomienda esperar al menos dos semanas para determinar el PSA tras un episodio de retención aguda de orina (Tchetgen and Oesterling, 1997); de manera

similar, los niveles de PSA se mantienen elevados tras una biopsia prostática por aproximadamente tres semanas (Tchetgen and Oesterling, 1997). El PSA tiene una vida media de 2,2 días (Stamey *et al.*, 1987), necesitando de periodos variables para recuperación de sus valores basales tras condiciones de elevación transitorias (Kawakami *et al.*, 2004; Tchetgen *et al.*, 1996; Chybowski *et al.*, 1992; Tchetgen and Oesterling, 1997). Aunque con variaciones porcentuales distintas, a los 6 meses de tratamiento con inhibidores de la 5-alfa reductasa, los valores de PSA se encuentran reducidos tanto en hombres en uso de finasteride como en los que usan dutasteride (Guess *et al.*, 1993). La diferencia entre las reducciones se explica por el mecanismo de acción de cada fármaco: mientras que el finasteride es un inhibidor competitivo de la 5-alfa reductasa isoforma tipo II, el dutasteride es un inhibidor de las isoformas tipo I y II (Roehrborn *et al.*, 2004). Distintos trabajos han defendido el ajuste de los valores de PSA medidos en sangre para preservar su habilidad de predicción de cáncer de próstata. Algunos autores defienden el principio de “multiplicar por 2”, en el cual el valor de PSA determinado en plasma debería ser multiplicado por dos si el paciente se encuentra en tratamiento con finasteride por más de 6 meses (España *et al.*, 2002). El *Proscar Long-term Efficacy and Safety Study* (PLESS), un estudio que analizó el principio de doblar los valores de PSA en hombres tratados con finasteride y la tasa de detección de cáncer basándose en el límite de PSA de 4 ng/mL, confirmó la eficacia del marcador en la detección del cáncer de próstata (Andriole *et al.*, 1998). El PSA es el marcador tumoral más utilizado en el diagnóstico y seguimiento respecto a cualquier otro tipo de cáncer (Lin K, 2011). El límite tradicionalmente utilizado como anómalo en la mayoría de los estudios de detección de cáncer de próstata ha sido 4,0 mg/mL (Brawer *et al.*, 1992; Catalona *et al.*, 1993; Mettlin *et al.*, 1991). La determinación del PSA condujo a un importante aumento de la incidencia de cáncer de próstata, con un pico máximo en el año 1992 (Ries L, 2002). La Sociedad Americana del Cáncer publicó un documento de recomendaciones acerca de la detección precoz del cáncer de próstata, en donde se analizó sistemáticamente distintas publicaciones sobre la determinación del PSA (Wolf *et al.*, 2010). Las concentraciones PSA se encuentran elevadas en 25 a 92 por ciento de los pacientes con cáncer de próstata, dependiendo del volumen tumoral (Stamey *et al.*, 1987; Hudson *et al.*, 1989; Partin *et al.*, 1990). Su habilidad en predecir la presencia de tumor representó un cambio de era en el tratamiento del cáncer de próstata. Sin embargo, eso conllevó a un elevado número de diagnósticos de tumores con importancia clínica dudosa, promoviendo un inevitable sobretratamiento de la enfermedad. Actualmente no hay un consenso a la hora de definir los cánceres clínicamente significativos, aunque distintas propuestas han sido publicadas. Parece ampliamente aceptado que tumores con

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

Gleason ≥ 7 y volúmenes $> 0,5 \text{ cm}^3$ tienen más riesgo de progresión, pese a que no se puede actualmente precisar si determinarán un cambio en la calidad de vida del paciente o en su supervivencia (Carroll *et al.*, 2001).

Debido a las inherentes limitaciones de estudios no experimentales para control de sesgos en la evaluación del cribado de cáncer (Cole and Morrison, 1980; Brawley and Kramer, 2005), la evidencia científica de ensayos clínicos controlados se hace necesaria para determinar la eficacia de un test de cribado. Dos ensayos clínicos prospectivos, controlados y aleatorizados de cribado de cáncer de próstata con PSA han reportado conclusiones diferentes: la rama prostática del estudio *Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian* (PLCO) demostró un no beneficio en el cribado, mientras que el *European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer* (ERSPC) demostró un 20% de reducción en la mortalidad por cáncer de próstata (riesgo relativo 0,80; intervalo de confianza 95% [IC95%] 0,67-0,98; $p < 0,01$) (Schröder *et al.*, 2009; Andriole *et al.*, 2009). Además de observar una reducción de la mortalidad por cáncer de próstata en el grupo de intervención comparado al control tras una media de 8,8 años de seguimiento, los investigadores del ERSPC notaron que una muerte por cáncer de próstata era prevenida para cada 48 hombres tratados por tumor detectado por cribado. Considerando el corto periodo de seguimiento, el número necesario para tratar estimado posiblemente sea menor a largo plazo (Wolf *et al.*, 2010). La diferencia entre los dos estudios cuanto a la extensión del pre cribado, contaminación entre los grupos analizados, cumplimiento de la indicación de biopsia y nivel de corte de PSA podría explicar porque una reducción significativa de mortalidad fue constatada en el ERSPC, pero no en el estudio PLCO. Globalmente, el valor predictivo positivo para los niveles de PSA $> 4,0 \text{ mg/mL}$ es de aproximadamente 30%, lo que significa que un poco menos de un tercio de los hombres con PSA elevado tendrá cáncer de próstata (Brawer *et al.*, 1992; Schröder *et al.*, 2000). Según la franja de valores del marcador, la probabilidad de detección de tumor varía. De esta manera, para los niveles de PSA entre 4,0 y 10,0 mg/dL, el valor predictivo positivo es de un 25% aproximadamente, aumentando a 42-64% para los niveles superiores a 10,0 mg/dL (Schröder *et al.*, 2000; Catalona *et al.*, 1994; Coley *et al.*, 1997). El PSA y el tacto rectal cuando combinados aumentan la tasa de detección del cáncer de próstata (Smith *et al.*, 2001), siendo recomendados en el cribado de la patología. Sin embargo, estudios aleatorizados no han podido confirmar el beneficio del tacto rectal en el desenlace de la enfermedad (Schröder *et al.*, 2009; Andriole *et al.*, 2009). Es conocida la influencia que ejerce la hiperplasia benigna de próstata en los valores de PSA determinados en sangre periférica, además la prevalencia del aumento benigno de la

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

glándula prostática es aun más significativa en mayores rangos etarios. Es comprensible, por lo tanto, suponer que los valores normales de PSA tendrían que basarse en rangos de edad. A pesar de su uso no está avalado de manera uniforme por las distintas guías de practica clínica, los intervalos de referencia específicos de edad han sido desarrollados a partir de grupos poblacionales sin enfermedad para mejorar el poder discriminatorio del marcador (Oesterling *et al.*, 1993; Dalkin *et al.*, 1993; DeAntoni, 1997), Tabla 1.

Tabla 1. Rango de referencia de PSA según franja etaria.

Edad (años)	Rango de referencia de PSA (mg/mL)		
	Oesterling et al. 1993	Dalkin et al. 1993	DeAntoni 1997
40-49	0,0 – 2,5	-	0,0 – 2,2
50-59	0,0 – 3,5	0,0 – 3,5	0,0 – 3,8
60-69	0,0 – 4,5	0,0 – 5,4	0,0 – 5,6
70-79	0,0 – 6,5	0,0 – 6,3	0,0 – 6,8

Adaptado de DeAntoni et al. (DeAntoni, 1997);

Parece lógico que el cambio del umbral de PSA para indicar una biopsia de próstata según la edad del paciente mejore la especificidad o la sensibilidad del test dependiendo del sentido del cambio, produciéndose de esa manera una reducción de las biopsias innecesarias o aumento de la detección de tumores. Pese al probable beneficio aquí expuesto, actualmente no se recomienda la adopción de los valores por franjas etarias (Heidenreich *et al.*, 2014b). Un análisis del *Prostate Cancer Prevention Trial* añadió incertidumbre a la fiabilidad de un único punto de corte para el PSA. Un 15,2% de los hombres controlados con edad entre 62 y 91 años, que tenían un PSA y tacto rectal normales durante los siete años de cribado anual, resultaron tener cáncer de próstata detectado por biopsia al final del estudio. Entre los pacientes con PSA entre 2,1 y 4,0 mg/mL, el 24,7% presentaban cáncer, siendo más de un 5% de alto grado, definido como Gleason ≥ 7 (Thompson *et al.*, 2004). En conclusión, un valor de referencia de PSA para cribado del cáncer de próstata implicará inexorablemente en un equilibrio entre la sensibilidad y la especificidad. Por ello, refinamientos y nuevos marcadores han sido la diana de inúmeros grupos de investigación con el objetivo de mejor predecir la presencia del cáncer y de seleccionar los clínicamente significativos para someterles a la biopsia. Además, es conocida la proporción de casi un 75% de cánceres detectados en pacientes con PSA entre 4,0 y 10,0 mg/mL ('la zona gris' del marcador), que son órgano-confinados

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

y curables (Catalona *et al.*, 1994). Por todo ello, actualmente no existe un valor de PSA predefinido aceptado universalmente como 'normal'.

Refinamientos del PSA y nuevos marcadores

El tejido tumoral prostático produce hasta 10 veces más PSA comparativamente al tejido sano. Basándose en esa diferencia de expresión de marcador, ajustar el valor de PSA por volumen prostático, parece mejorar la capacidad de predecir la presencia de cáncer (Stamey *et al.*, 1987; Benson *et al.*, 1992). La mayor limitación de este método es su dependencia a la precisión en la determinación del volumen prostático. Además la dependencia de una prueba de imagen, ecografía transrectal o resonancia magnética nuclear (RNM), limita su uso en unidades de salud de baja complejidad.

El PSA aumenta de manera más rápida en pacientes con cáncer de próstata que en hombres sanos. Algunos autores han reportado una mejor discriminación entre los pacientes con cáncer y sin enfermedad basada en la velocidad de subida del marcador en sangre periférico, tomando como referencia el valor de 0,75 ng/mL/año (Carter *et al.*, 1992). Sin embargo, estudios controlados y aleatorizados como el ERSPC y el *Prostate Cancer Prevention Trial* han cuestionado el beneficio de la velocidad de PSA en el cribado del cáncer de próstata. En el primer estudio, los resultados apuntan a una diferencia de velocidad de PSA entre los pacientes con y sin tumor en la biopsia, pese a ello la velocidad de PSA no se mostró como factor predictor independiente de cáncer de próstata (Raaijmakers *et al.*, 2004). Información corroborada por un subanálisis realizado en pacientes del *Prostate Cancer Prevention Trial* (Thompson *et al.*, 2006). Además ese segundo estudio enfatizó el aumento de biopsias innecesarias secundarias a la utilización de este refinamiento de PSA. En conclusión, aunque es conocida la diferencia de expresión del marcador entre los tejidos sanos y tumorales, la determinación de la velocidad de PSA añade poca mejoría predictiva al PSA total en el cribado del cáncer de próstata

El PSA circula en la sangre periférica en múltiples isoformas, predominantemente unida a un inhibidor de proteasa, sin embargo una forma de PSA, el PSA libre, no se encuentra unida a estas proteínas (Christensson *et al.*, 1990; Lilja *et al.*, 1991). Porcentuales bajos de PSA libre son reconocidos indicadores de cáncer de próstata (Catalona *et al.*, 1995; Partin *et al.*, 1996; Elgamal *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1996), aunque la selección de puntos de corte para uso en la práctica clínica es complicada por la

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

dependencia parcial entre los valores de la ratio de PSA (%PSA libre/PSA total) y la edad del paciente, el volumen prostático y el PSA total (Catalona *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Luderer *et al.*, 1995; Woodrum *et al.*, 1998). De acuerdo con las guías de la *European Association of Urology* (EAU) y *American Urological Association* y las recomendaciones de *United States Food and Drug Administration* (FDA) la medición de la ratio de PSA estaría indicada en hombres con PSA total entre 4,0 y 10,0 mg/dL. Sin embargo existe evidencia que sería más aplicable en hombres con PSA entre 2,0 y 20 mg/dL (Oesterling *et al.*, 1995; Morote *et al.*, 2002). Un estudio multicéntrico realizado con 773 hombres con PSA entre 4,0 y 10,0 mg/mL y tacto rectal normal concluyó que utilizando un corte de 25% para la ratio de PSA, detectaba 95% de los cánceres y evitaba un 20% de biopsias innecesarias (Woodrum *et al.*, 1998).

[2] ProPSA y el *Prostate Health Index*

El PSA libre es enzimáticamente inactivo y está compuesto por tres diferentes tipos de PSA: el PSA benigno usualmente asociado a la hiperplasia benigna de próstata, el PSA intacto que es similar a la forma activa y el proPSA que en general está asociado al cáncer de próstata (Hori *et al.*, 2013). Diferentes formas trucadas de proPSA han sido descritas, sin embargo hoy en día a estos marcadores se les exige una habilidad en detectar tumores agresivos y evitar el sobrediagnóstico. El [2] ProPSA, también conocido como p2PSA, es una isoforma específica del proPSA, más frecuente en pacientes con biopsias positivas para tumor. Además algunos trabajos han asociado diferentes isoformas de PSA para formar un marcador con mejor poder de predicción como el *Prostate Health Index* (ϕ), $[(p2PSA \text{ pg} \times \text{ml}/fPSA \text{ ng/ml}) \times \sqrt{tPSA \text{ ng/ml}}]$ (Perdonà *et al.*, 2013). Un reciente estudio multicéntrico europeo analizó 646 hombres con PSA entre 2 y 10 mg/mL con una tasa media de detección de cáncer de próstata de 40,1%. El área debajo de la curva (AUC del inglés, *area under de curve*), que estima la precisión de una prueba diagnóstica, del ϕ y del %PSA libre fue 0,67 y 0,64, respectivamente. Con una tasa de detección del 90%, se ahorró un 15,5% de biopsias innecesarias, dejando de diagnosticar apenas un 1,1% de tumores agresivos (Lazzeri *et al.*, 2013). A pesar de resultados promisorios, el significado clínico de estos derivados del PSA permanece incierto, debido principalmente a la existencia de distintos estudios con variables niveles de evidencia. Además existe una falta de evidencia a cerca de su eficacia cuando complementados con los datos clínicos.

4Kscore Test

El 4Kscore Test (OPKO *Diagnostics*, LLC) incorpora en un algoritmo determinaciones séricas de cuatro proteínas kalecreinas: PSA total, PSA libre, PSA intacto y Kalecreina humana tipo 2, además de parámetros clínicos (edad, tacto rectal y historia previa de biopsia negativa). Dicho test ha sido extensivamente validado en distintos estudios (12) prospectivos y retrospectivos, que involucraron más de 22.000 pacientes de países europeos y de los Estados Unidos (Vickers *et al.*, 2008; Benchikh *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2010; Vickers *et al.*, 2010a, 2010b, 2010c; Bryant *et al.*, 2015; Parekh *et al.*, 2015). Tiene como objetivo determinar el riesgo porcentual de cáncer de próstata agresivo (Gleason ≥ 7) y fornecer información adicional en hombres sometidos a cribado. Un estudio clínico reciente ha reportado una reducción del número de biopsias de 64,6%, mayor que las tasas teóricas de entre 30 y 57% de largos estudios previos (Konety *et al.*, 2015). El 4Kscore Test cobra protagonismo como un método de seguimiento en pacientes con sospecha de cáncer de próstata (tacto rectal anormal y/o PSA total elevado), con el objetivo de evitar biopsias innecesarias. Su uso añade al PSA especificidad y mejora la relación coste-eficacia (Konety *et al.*, 2015).

PCA3

El *prostate cancer antigen 3* (PCA 3 - DD3) es un gen que codifica para un ARN mensajero (ARNm) no codificante con alta tasa de expresión en el tejido tumoral prostático, está entre los marcadores de cáncer de próstata más específicos y está sobre expresado en más de 90% de los cánceres de próstata (Tomlins, 2014). El PCA 3 ha sido aprobado por la FDA para auxiliar en la decisión de biopsiar hombres con biopsias previas negativas (de la Taille *et al.*, 2011; Goode *et al.*, 2013). Por otro lado, otros autores han reportado resultados promisorios en pacientes sin biopsias previas (Rubio-Briones *et al.*, 2015). En los últimos años la elaboración de nomogramas así como la fusión de distintos marcadores urinarios han proporcionado nuevas posibilidades a la hora de predecir la presencia del cáncer de próstata. La precisión del test PCA3 aumenta de acuerdo con el volumen tumoral, sin embargo existe resultados conflictivos a cerca de si es capaz de predecir la agresividad del tumor, además su beneficio en protocolos de vigilancia activa aún no esta confirmado (Auprich *et al.*, 2011). Actualmente valorar la necesidad de una rebiopsia es la indicación globalmente aceptada para ese test diagnóstico.

Técnicas de imagen y la biopsia de próstata

La ecografía transrectal pese a que no tiene precisión diagnóstica, es el método auxiliar más frecuentemente empleado para guiar las biopsias de próstata actualmente. Como prueba diagnóstica o selección de lesiones sospechas, la ecografía transrectal presenta poca precisión. Con una sensibilidad entre 18-96% y una especificidad entre un 46-91%, es comprensible los sucesivos intentos de mejoría de la técnica ecográfica (escala de grises, con contraste, elastografía) (Brock *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 1991; Walz *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2014). Pese a ello, la utilidad de la ecografía en la detección se limita a la función de guía de punción y usualmente es complementada por otras técnicas de imagen.

En 2008, Dr. Patrick Walsh hizo el célebre comentario: “ el descubrimiento que tendría mayor impacto en nuestra practica médica, sería el desarrollo de una técnica de imagen con precisión para detectar el tumor dentro de la próstata” (Walsh, 2009). En poco tiempo, la RNM se ha convertido en la técnica de imagen más fiable a la hora de interpretar una lesión intraprostática, capaz de identificar con precisión cánceres de próstata con significado clínico (Puech *et al.*, 2009). Cuando parámetros funcionales como de dinámica mejorada con contraste (*dynamic contrast enhancement* - DCE), la RNM potenciada en difusión (*diffusion-weighted imaging* - DWI) y la espectrometría son usados, en combinación con las secuencias estándar T1 y T2, la RNM incrementa su habilidad de identificar una lesión tumoral a partir de sus propiedades patofisiológicas (Kirkham *et al.*, 2006). En hombres con sospecha clínica de cáncer de próstata, una biopsia de próstata con información adicional aportada por la RNM se asocia con una tasa de 42% de detección de tumores clínicamente significativos. Con la utilización de la RNM como información adicional, se podría reducir el número de hombres que requieren una biopsia de próstata probablemente a un tercio, si previamente presentan una RNM normal (Moore *et al.*, 2013). Aunque la precisión diagnóstica de la RNM será definida cuando se publique los resultados del ensayo clínico PROMIS *Trial* (NCT01292291), se estima que un área no sospechosa por RNM multiparamétrica presenta un 95% de probabilidad de no tener cáncer de próstata clínicamente significativo (El-Shater Bosaily *et al.*, 2015). Estudios recientes han defendido el papel diagnóstico de las biopsias transrectales guiadas por ecografía fusionadas a imágenes de RNM multiparamétrica. La biopsia por fusión por un lado parece aumentar la tasa de detección de cáncer de próstata, además incrementa el diagnóstico de tumores clínicamente relevantes (Haffner *et al.*, 2011). La eficiencia (número de tumores clínicamente significativos/número de

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

hombres biopsiados) en procedimientos con fusión parece ser superior que el método estándar (70% vs 40%) (Moore *et al.*, 2013).

El clásico sistema de biopsia por sextantes, definido como sistema aleatorio por Stamey en 1989 (Hodge *et al.*, 1989), ha incorporado cilindros a lo largo del tiempo. Actualmente 10-12 cilindros es globalmente aceptado como la práctica clínica estándar a la hora de realizar una biopsia de próstata. El aumento del número de cilindros ha aumentado el valor predictivo negativo de las biopsias transrectales, sin embargo ha incrementado la detección de tumores de bajo volumen y bajo riesgo. Además, el método de biopsia estándar tiene baja precisión en la detección de cánceres en la cara anterior, línea media y ápex prostático, culminando en infradiagnóstico de enfermedad clínicamente significativa. Una de cada tres biopsias de bajo volumen tumoral, enfermedad de bajo riesgo es reclasificada en un grado o estadio superior tras un estudio histológico de toda la pieza de prostatectomía (King *et al.*, 2004). La próstata es el único órgano sólido, en el cual el sistema de toma de biopsias es de muestreo aleatorio estandarizado. Todos los otros sistemas de diagnóstico de cánceres de órganos sólidos o no sólidos incorpora un método guía sea este directo (ej., cistoscopia) o radiológico (ecografía, tomografía, RNM), capaz de identificar áreas sospechosas de malignidad con precisión (Moore *et al.*, 2013).

El cribado del cáncer de próstata

El cribado del cáncer de próstata (poblacional u oportunístico) tiene como objetivo principal la reducción de la mortalidad cáncer específica y mantener la calidad de vida ajustada a los años de vida ganados con el cribado (QUALYs) (Heidenreich *et al.*, 2014b). Tres grandes ensayos clínicos prospectivos reflejan la gran controversia del cribado de esta neoplasia (Andriole *et al.*, 2009; Schröder *et al.*, 2009; Hugosson *et al.*, 2010). Asertivas a raíz de análisis de subgrupos de los ensayos o proyecciones matemáticas no ofrecen evidencia científica suficiente para realizar recomendaciones estándar universales. Una revisión sistemática Cochrane publicada en el 2013 (Ilic *et al.*, 2013) encontró que el cribado se asoció con un aumento del diagnóstico de cáncer de próstata (RR: 1,3; IC95%: 1,02-1,65); con mayor número de casos de enfermedad localizada (RR: 1,79; IC95%: 1,19-2,70) y menor proporción de enfermedad avanzada (T3-4, N1, M1) (RR: 0,80; IC95%: 0,73-0,87). El análisis de 5 ensayos clínicos, que involucró más de 341.000 pacientes aleatorizados, no observó un beneficio en la mortalidad cáncer-específica (RR: 1,00; IC95%: 0,86-1,17), tampoco de la supervivencia global (RR: 1,00;

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

IC95%:0,96-1,03). Además, los autores destacan el sobrediagnóstico secundario al cribado y consecuente sobretratamiento (Andriole *et al.*, 2010; Thompson *et al.*, 2003). Recomendaciones a cerca del cribado de PSA han sido motivo de cambios substanciales a lo largo de los últimos años. En 2012, el *US Preventive Services Task Force* (USPSTF) desaconsejó el cribado de cáncer de próstata con el PSA (Moyer and U.S., 2012). Las guías clínicas de las distintas sociedades urológicas han fundamentado sus recomendaciones en intervalos de edad específicos y expectativa de vida, basados en decisión compartida médico-paciente y preferencias de cada paciente cuanto a los intervalos de análisis superiores al año (Heidenreich *et al.*, 2014b; Wolf *et al.*, 2010), (Carter *et al.*, 2013; Qaseem *et al.*, 2013) . La Figura 2 resume las recomendaciones de cribado y detección precoz de la EAU.

Figura 2. Recomendaciones de las guías de practica clínica EAU para cribado y detección precoz del cáncer de próstata.

Recommendation	LE	GR
Do not subject men to PSA testing without counselling them on the potential risks and benefits.	3	B
Offer an individualised risk-adapted strategy for early detection to a well-informed man with a good performance status and a life-expectancy of at least 10-15 years.	3	B
Offer early PSA testing in men at elevated risk of having PCa: <ul style="list-style-type: none"> • men > 50 years of age • men > 45 years of age and a family history of PCa • African-Americans > 45 years of age • men with a PSA level of > 1 ng/mL at 40 years of age • men with a PSA level of > 2 ng/mL at 60 years of age 	2b	A
Offer a risk-adapted strategy (based on initial PSA level), with follow-up intervals of 2 years for those initially at risk: <ul style="list-style-type: none"> • men with a PSA level of > 1 ng/mL at 40 years of age • men with a PSA level of > 2 ng/mL at 60 years of age Postpone follow-up to 8 years in those not at risk.	3	C
Decide on the age at which early diagnosis of PCa should be stopped based on life expectancy and performance status; men who have a life-expectancy of < 15-years are unlikely to benefit based on data from the PIVOT and the ERSPC trials.	3	A

ERSPC = European Randomized Study of Screening; PCa = prostate cancer; PIVOT = Prostate Cancer Intervention Versus Observation Trial; PSA = prostate-specific antigen.

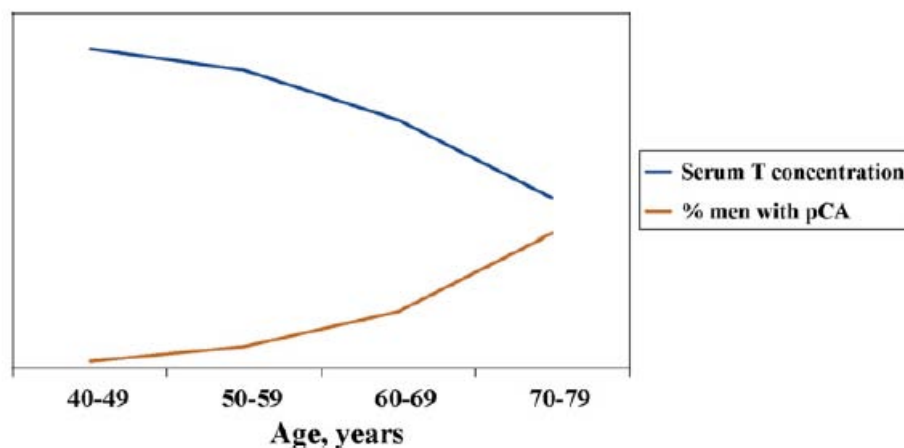
Figura extraída de *European Association of Urology Guidelines 2016 – March update* (Heidenreich *et al.*, 2014b).

1.2 Los andrógenos y el cáncer de próstata

Desde que Huggins y Hodges en 1941 describieran la hormono dependencia del cáncer de próstata, la elevación de los niveles de testosterona en suero ha sido relacionada con la carcinogénesis prostática. Huggins fue el primer médico a realizar un ensayo intervencionista con pacientes con cáncer de próstata y definió una línea de investigación denominada Hipótesis Androgénica que culminó en la descubierta de dianas terapéuticas aún exploradas hoy en día más de 70 años tras sus experimentos (Huggins and Hodges, 1941). Históricamente, ha sido globalmente aceptado que la testosterona constituye un estímulo directo para el desarrollo del cáncer de próstata.

La lógica de la relación directa entre los niveles de testosterona y la carcinogénesis prostática ha sido cuestionada en los últimos años. La inquietud científica se basa en una sencilla constatación epidemiológica: la presencia de cáncer de próstata durante la edad de pico de concentración de testosterona sérica es anecdótica, mientras que hombres en mayor franja etaria que presentan progresivamente menores niveles de testosterona, son los más afectados por la neoplasia (Morgentaler, 2006), Figura 4. Si la testosterona verdaderamente es el “combustible para un fuego”, entonces ¿por qué los microfocos de cáncer de próstata detectado en una autopsias de hombres jóvenes no desarrollan en cáncer clínicamente activo en edades precoces dotadas de alto ambiente androgénico (Sakr *et al.*, 1994)?

Figura 4. Prevalencia del cáncer de próstata y los niveles de testosterona según la edad.

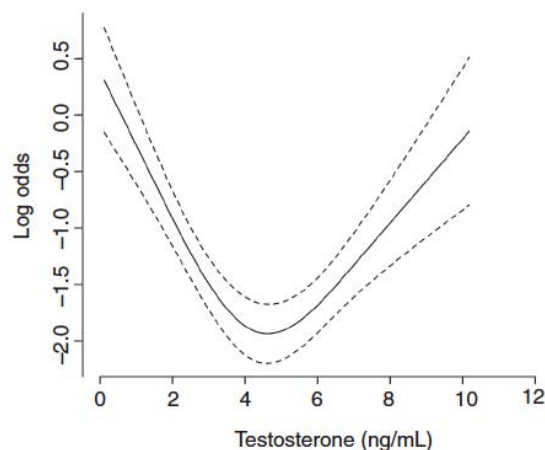


T: testosterona, pCA cáncer de próstata. Figura extraída de Morgentaler et al. Testosterone and prostate cancer: an historical perspective on a modern myth. Eur Urol 2006; 50(5):935-9 (Morgentaler, 2006).

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

Algunos autores han publicado estudios relacionando el cáncer de próstata con bajos niveles de testosterona sérica. De manera opuesta, el cáncer de próstata sería más frecuente y más agresivos en ambientes de bajas concentraciones de testosterona. En 2011, Salonia et al. analizaron los niveles de testosterona preoperatorios en una serie de 673 pacientes sometidos a prostatectomía radical con el objetivo de evaluar la relación entre hipogonadismo, definido por una testosterona total inferior a 300 ng/dL y la enfermedad de alto riesgo definida por la extensión extracapsular, invasión de vesículas seminales y suma de Gleason superior a 7. Los autores encontraron que solamente los pacientes con hipogonadismo severo, definido por un nivel de testosterona total inferior a 100 ng/dL, tuvieron un riesgo 3 veces superior de tener afectación de vesículas seminales (Salonia et al., 2011). En una publicación sucesiva en 2012, esos mismos autores vuelven a estudiar la relación entre testosterona total y cáncer de próstata de alto riesgo. Después de analizar los modelos en su análisis multivariante, establecieron que la probabilidad de tener un cáncer de próstata de alto riesgo aumentaba cuando los niveles de testosterona total eran extremos, tanto reducidos como aumentados. Esta observación generó la formulación de una nueva hipótesis, alternativa a la hipótesis androgénica, en la cual se establecía un modelo de comportamiento no lineal, conocido como '*U-shaped risk behavior*' (Salonia et al., 2012), figura 5.

Figura 5. Relación entre testosterona total sérica (ng/mL) y cáncer de próstata de alto riesgo en prostatectomías radicales. El eje Y representa el riesgo de cáncer de alto riesgo (escala logarítmica).



Los resultados de años de investigación han llevado a formular las tres distintas hipótesis aquí referidas que, pese a sus planteamientos lógicos, no han permitido concluir definitivamente qué papel tiene la testosterona en la carcinogénesis prostática.

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

La unión de los andrógenos con su receptor y las reacciones sucesivas promueven la activación de las zonas promotoras de genes andrógeno-regulados modulando su transcripción. Su expresión normal es necesaria para mantener el equilibrio entre señales de proliferación y apoptosis, regeneración tisular y producción de ciertas proteínas específicas como el PSA (Schulman *et al.*, 2010).

Alrededor del 95% de la testosterona circulante es producida por las células de Leydig en el intersticio testicular como respuesta al estímulo de la hormona luteinizante (LH), secretada en la hipófisis anterior. El 5% restante proviene del córtex adrenal. Sin embargo, en pacientes castrados se ha descrito la persistencia hasta del 20% de la testosterona y del 30% de la dihidro-testosterona (DHT) habitual en el tejido prostático, como consecuencia de la síntesis intraglandular de hormonas esteroideas (Schulman *et al.*, 2010).

El parámetro que se ha considerado más representativo de la actividad androgénica intraprostática es la testosterona total en suero. Sin embargo, la mayoría de la testosterona esta ligada a proteínas plasmáticas, en concreto albumina y globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG). Alrededor del 44% de la testosterona total está ligada con alta afinidad a la SHBG y por ello no está disponible para unirse al receptor androgénico. Algo más del 50% esta unida a la albúmina con baja afinidad, significando ello que en determinadas circunstancias puede pasar fácilmente a la forma libre. Sólo entre el 1 y 2% de la testosterona total en suero esta en forma libre y constituye la isoforma biológicamente activa, capaz de difundir hacia el citoplasma celular y unirse a su receptor específico, una vez transformada en DHT por acción de la 5-alfa-reductasa. La suma de la fracción de testosterona ligada de manera reversible a la albumina y la testosterona libre constituye la fracción de testosterona biodisponible (Matsumoto and Bremner, 2004; Rove *et al.*, 2012).

Es ampliamente aceptado que la actividad biológica de una determinada hormona depende de su fracción libre, teoría conocida como Hipótesis de la Hormona Libre postulada por Mendel *et al.* hace 17 años (Mendel, 1989). Consecuentemente, la testosterona libre podría representar un mejor indicador de la actividad androgénica que la testosterona total y, además, correlacionarse de manera más fiable con los niveles intraprostáticos de testosterona. ¿Podría la falta de evidencia científica acerca del papel de la testosterona en la carcinogénesis prostática deberse a que hasta entonces estudiábamos la molécula equivocada?

Algunos autores han publicado resultados contradictorios acerca del papel de la testosterona libre en el cáncer de próstata: mientras algunas publicaciones defienden una relación (directa o inversa), otras no objetivaron una asociación significativa (Grosman *et al.*, 2010; Garcia-Cruz *et al.*, 2012; Hyde *et al.*, 2012; Kaaks *et al.*, 2003; Wiren *et al.*, 2007; Sawada *et al.*, 2010). Existen fórmulas que permiten el cálculo de la testosterona libre y de la testosterona biodisponible, a partir de los niveles de la testosterona total, albúmina y SHBG (Vermeulen *et al.*, 1999). Sin embargo, determinadas condiciones nosológicas pueden acompañarse de alteraciones en las concentraciones de albúmina y SHBG; por ello, las estimaciones de la testosterona libre y biodisponible pueden ser inadecuadas. La falta de evidencia científica en los estudios que trataron de buscar una relación entre riesgo y/o agresividad tumoral y la testosterona libre podría deberse a que los distintos autores se basaron en valores estimados de testosterona libre, conceptualmente poco precisos (Shea *et al.*, 2014). No obstante en la actualidad, a través de radioinmunoanálisis (RIA) comerciales, es posible la determinación directa de la testosterona total en suero. La escasez de estudios con métodos de determinación directa de la fracción libre de la hormona, da lugar a la cuestión: “¿tiene la testosterona libre determinada por RIA relación con la carcinogénesis prostática?”

La deprivación androgénica es la modalidad de hormonoterapia más frecuentemente utilizada, y se recomienda en pacientes con cáncer de próstata avanzado y de forma neoadyuvante a la radioterapia (Heidenreich *et al.*, 2014a). El objetivo de la deprivación androgénica es la depleción sistémica de testosterona, y se consigue mediante la castración quirúrgica o médica, a través de la administración de análogos o antagonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH). No obstante, esa depleción de testosterona no es completa, ya que además de la síntesis testicular, el córtex suprarrenal aporta entre el 5% y el 10% de la testosterona sérica, y en determinadas circunstancias el mismo tejido prostático puede sintetizar andrógenos, aunque su contribución a la concentración de testosterona es probablemente imperceptible (Hu *et al.*, 2010). Las guías de práctica clínica recomiendan la determinación sistemática de la testosterona total con el intuito de verificar la eficacia de la terapia de deprivación androgénica y para confirmar el status de resistencia a la castración (Heidenreich *et al.*, 2014a). Pese a ello, al día de hoy el nivel de deprivación óptimo sigue siendo controvertido, así como su papel pronóstico. Añadimos aún más incertidumbre si cuestionamos el papel de la testosterona total como representante más fiable de la actividad androgénica. ¿Sería la testosterona libre la diana correcta? Es el momento de dilucidar la asociación testosterona-cáncer de próstata a partir de su forma

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

biológicamente activa. ¿Podría la testosterona libre determinada en suero relacionarse con el riesgo de cáncer, la agresividad tumoral y, además, ser útil en el control de la enfermedad avanzada tratada mediante deprivación androgénica?

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

2. Hipótesis de trabajo

La testosterona libre, determinada en suero y mediante RIA, se relaciona mejor que la testosterona total con el riesgo de detección de cáncer de próstata y con su agresividad. En pacientes con cáncer de próstata sometidos a deprivación androgénica nuestra hipótesis postula que los niveles de testosterona libre predicen mejor que los de testosterona total la supervivencia libre de resistencia a la castración.

3. Objetivos

1. Analizar la asociación y valor predictivo de los niveles séricos de testosterona total y testosterona libre y el riesgo de detección de cáncer de próstata en pacientes con sospecha basada en la elevación de PSA y/o alteración del tacto rectal.
2. Analizar la asociación y valor predictivo de los niveles séricos de testosterona total y testosterona libre y la agresividad tumoral.
3. Analizar los niveles de testosterona total y testosterona libre como factores predictivos de la supervivencia libre de resistencia a castración en pacientes sometidos a terapia de deprivación androgénica.
4. Establecer el menor nivel sérico de testosterona total y testosterona libre con impacto clínico en la supervivencia libre de resistencia a la castración.

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

4. Metodología

Se trata de un estudio realizado con recogida prospectiva de datos (base de datos 1) entre los años 2007 y 2014 y recogida retrospectiva de datos (base de datos 2). La Base de Datos 1 fue compuesta por 3364 pacientes pertenecientes al Programa de Diagnóstico Rápido de Cáncer de Próstata – Servicio de Urología, Hospital Universitario Vall d'Hebron. Todos los pacientes fueron sometidos a biopsia transrectal ecoguiada (*Falcon 2101, B-K Medical Inc., Denmark*) a raíz de sospecha clínica de cáncer de próstata por elevación del PSA y/o tacto rectal anormal. Se realizó el muestreo de 10 cilindros más 2 a 8 cilindros adicionales en los primeros 2518 procedimientos de acuerdo con la edad y el volumen prostático, y 12 cilindros posteriormente. La base de datos 2 fue compuesta por 126 pacientes con diagnóstico histológico de cáncer de próstata avanzado sometidos a terapia de deprivación androgénica con agonista LHRH, recogida retrospectiva de los datos clínico-demográficos y perfil hormonal. Las variables clínico-demográficas recogidas fueron edad, índice de masa corporal, PSA total y libre, tacto rectal, volumen prostático, resultado de la biopsia, suma Gleason, estadiaje patológico (TNM 2002) y perfil hormonal (testosterona total y testosterona libre).

La intervención realizada fue la determinación directa de la testosterona total mediante método enzimático competitivo de quimioluminiscencia con límite inferior de detección de 10,0 ng/dL (*Immulite 2500 automated analyzer, DPC Inc., Los Angeles, CA, USA*) y de testosterona libre mediante método de radioinmunoanálisis con límite inferior de detección de 0,05 pg/mL (*DPC Inc., Los Angeles, CA, USA*). Los objetivos principales fueron establecer la relación de la testosterona total y libre con la detección de cáncer de próstata y la predicción de su agresividad según riesgo D'Amico (cáncer de próstata de alto riesgo: estadio clínico cT3a+ o PSA > 20 ng/ml o suma Gleason 8 a 10); y analizar el valor predictivo de los niveles de testosterona total y testosterona libre en la supervivencia libre de resistencia a castración en pacientes sometidos a deprivación androgénica, así como el nivel inferior con impacto clínico.

Análisis estadístico mediante SPSS v.20 (IBM Inc.): Test de U de Mann-Whitney, Wilcoxon, Kruskal-Wallis, Chi cuadrado, Cochran de acuerdo con el tipo de variable. Análisis univariante mediante regresión logística binaria. Análisis multivariante mediante regresión Cox. Análisis de curva de supervivencia Kaplan-Meier y test de log-Rank y Breslow (supervivencia libre de resistencia a la castración).

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

5. PARTE PRINCIPAL - CUERPO DE LA TESIS

Este proyecto se ha desarrollado a través de la publicación de los siguientes artículos científicos

1. Behavior of total and free serum testosterone as a predictor for the risk of prostate cancer and its aggressiveness.

Regis L, Planas J, Celma A, deTorres I, Ferrer R, Morote J.

Actas Urol Esp. 2015;39(9):573-81.

Factor de impacto: 1,022; cuarto cuartil (JCR) en el área de urología.

2. Determined Free Serum Testosterone is Better than Total Testosterone as a Predictor of Prostate Cancer Risk.

Regis L, Planas J, Celma A, deTorres I, Ferrer R, Morote J.

International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB). 2015;3(9):22-32.

Factor de impacto: 2,991; primer cuartil (SJIF) *natural science*

3. Measurement of serum testosterone during androgenic suppression in patients with prostate cancer: A systematic review

Morote J, **Regis L**, Celma A, Planas J.

Actas Urol Esp. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2016.01.006>

Factor de impacto: 1,022; cuarto cuartil (JCR) en el área de urología.

Anexo.

1. Free testosterone: a better surrogate than total testosterone to predict survival free of castration resistance.

Regis L, Planas J, Carles J, Maldonado X, Comas I, Ferrer R, Morote J.

Submitted to Journal of Urology on March 2016.

Factor de impacto: 4,360; primer cuartil (JCR) en el área de urología.



Actas Urológicas Españolas

www.elsevier.es/actasuro



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Comportamiento de la testosterona total y libre en suero como predictores del riesgo de cáncer de próstata y de su agresividad

L. Regis^{a,*}, J. Planas^{a,b}, A. Celma^{a,b}, I.M. de Torres^{b,c,d}, R. Ferrer^d y J. Morote^{a,b,e}

^a Servicio de Urología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España

^b Unidad Institut de Recerca Vall d'Hebron, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

^c Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España

^d Servicio de Bioquímica, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España

^e Departamento de Cirugía, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

Recibido el 6 de marzo de 2015; aceptado el 13 de marzo de 2015

PALABRAS CLAVE

Cáncer de próstata;
Diagnóstico;
Agresividad;
Andrógenos;
Testosterona;
Testosterona libre

Resumen

Contexto: La testosterona en suero está unida mayoritariamente a la hormona transportadora de esteroides sexuales y a la albúmina, existiendo una pequeña parte metabólicamente activa en forma de testosterona libre (TL). La relación entre los niveles séricos de testosterona total (TT) y la carcinogénesis prostática es controvertida. Nuestra hipótesis es que la concentración de TL en suero se relacionaría mejor que la de TT con el riesgo de cáncer de próstata (CP) y su agresividad.

Objetivo: Analizar la evidencia científica que ha relacionado los niveles séricos de TT y/o TL con el diagnóstico de CP y su agresividad.

Adquisición de la evidencia: Se ha realizado una revisión sistemática en PubMed hasta enero de 2015, utilizando los términos MeSH: *prostate cancer, sex hormone, androgen, testosterone, free testosterone*.

Síntesis de la evidencia: Se encontraron 460 publicaciones, de las cuales se han revisado 124 para analizar la evidencia. La relación entre niveles séricos de TT y el diagnóstico de CP y su agresividad es muy heterogénea. La variabilidad en el diseño de los estudios, en los métodos de cuantificación y otras variables puede justificar esta heterogeneidad. En algunos estudios en los que se ha evaluado la TL calculada o determinada la evidencia sigue siendo igualmente contradictoria.

Conclusiones: La evidencia actual no permite recomendar la determinación sérica de TT y/o TL en el proceso diagnóstico del CP ni en la evaluación de su agresividad.

© 2015 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lucasregis@gmail.com (L. Regis).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2015.03.004>

0210-4806/© 2015 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Prostate cancer;
Diagnosis;
Aggressiveness;
Androgens;
Testosterone;
Free testosterone

Behavior of total and free serum testosterone as a predictor for the risk of prostate cancer and its aggressiveness

Abstract

Context: Serum testosterone is mostly bound to the sex hormone-binding globulin and albumin. A small metabolically active part is present in the form of free testosterone (FT). The relationship between serum total testosterone (TT) levels and prostate carcinogenesis is debated. Our hypothesis is that the serum FT concentration is more closely associated with the risk of prostate cancer (PC) and its aggressiveness than TT.

Objective: To analyze the scientific evidence that relates serum TT and/or FT levels with the diagnosis of PC and its aggressiveness.

Acquisition of evidence: A systematic review was conducted in PubMed up to January 2015 using the following mesh terms: prostate cancer, sex hormone, androgen, testosterone and free testosterone.

Synthesis of the evidence: We found 460 publications, 124 of which were reviewed to analyze the evidence. The relationship between serum TT levels and the diagnosis of PC and its aggressiveness is highly heterogeneous. The variability in the design of the studies, the quantification methods and other variables could explain this heterogeneity. In a number of studies that evaluated the estimated or measured FT, the evidence remains equally conflicting.

Conclusions: Based on the current evidence, we cannot recommend the measurement of serum TT and/or TL levels for the diagnosis of PC or for assessing its aggressiveness.

© 2015 AEU. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El cáncer de próstata (CP) es el tumor sólido más frecuentemente diagnosticado entre los varones de los países industrializados. En Europa se estima una incidencia de 59,3 casos por cada 100.000 hombres y constituye el 15% de las neoplasias masculinas¹.

El crecimiento y desarrollo normal de la glándula próstata requiere de la existencia de andrógenos. Desde que Huggins y Hodges en 1941 describieran la hormonodependencia del CP, la elevación de los niveles de testosterona en suero ha sido relacionada con la carcinogénesis prostática². Por otra parte, algunos estudios realizados sobre especímenes de prostatectomía radical (PR) sugieren que niveles séricos bajos de testosterona total (TT) se asocian a tumores más agresivos³. Hoy en día, la mayoría de las guías clínicas de práctica clínica solo recomiendan la determinación de TT durante el seguimiento de la supresión androgénica.

La testosterona libre (TL) es la fracción activa del conjunto androgénico, y por ello podría relacionarse de manera más fiable que la TT con el riesgo de detección de CP y su agresividad. El objetivo de este estudio ha sido realizar una revisión sistemática de la literatura para conocer la relación que existe entre los niveles séricos de TT y/o TL y el riesgo de CP y su agresividad.

Adquisición de la evidencia

Se ha realizado una revisión sistemática de la literatura en PubMed hasta enero de 2015. Las palabras del *Medical Subject Headings* fueron: *prostate cancer, sex hormone, androgen, testosterone, free testosterone*. Se seleccionaron artículos realizados en humanos, adultos y publicados

en inglés o castellano. Se encontraron 460 publicaciones, de las cuales se han seleccionado 124 artículos que analizan el riesgo de detección de CP y su agresividad con las concentraciones séricas de TT o TL (fig. 1).

Síntesis de la evidencia

Comportamiento de la testosterona en suero

La unión de los andrógenos con su receptor y las reacciones sucesivas promueven la activación de las zonas promotoras de genes andrógeno-regulados modulando su transcripción. Su expresión normal es necesaria para mantener el equilibrio entre señales de proliferación y apoptosis, regeneración tisular y producción de ciertas proteínas específicas como el PSA. Actualmente, existen fármacos desarrollados para inhibir la síntesis de testosterona en distintos niveles cuyo objetivo final sería bloquear el crecimiento celular prostático⁴.

Alrededor del 95% de la testosterona circulante es producida por las células de Leydig en el intersticio testicular como respuesta al estímulo de la hormona luteinizante, secretada en la hipófisis anterior. El 5% restante proviene del córtex adrenal. Sin embargo, en pacientes castrados se ha descrito la persistencia hasta del 20% de la testosterona y del 30% de la dihidro-testosterona (DHT) habitual en el tejido prostático, como consecuencia de la síntesis intraglandular de hormonas esteroideas⁴.

El parámetro que se ha considerado más representativo de la actividad androgénica intraprostática es la TT en suero. Sin embargo, la mayoría de la testosterona está ligada a proteínas plasmáticas, en concreto albúmina y globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG). Alrededor del

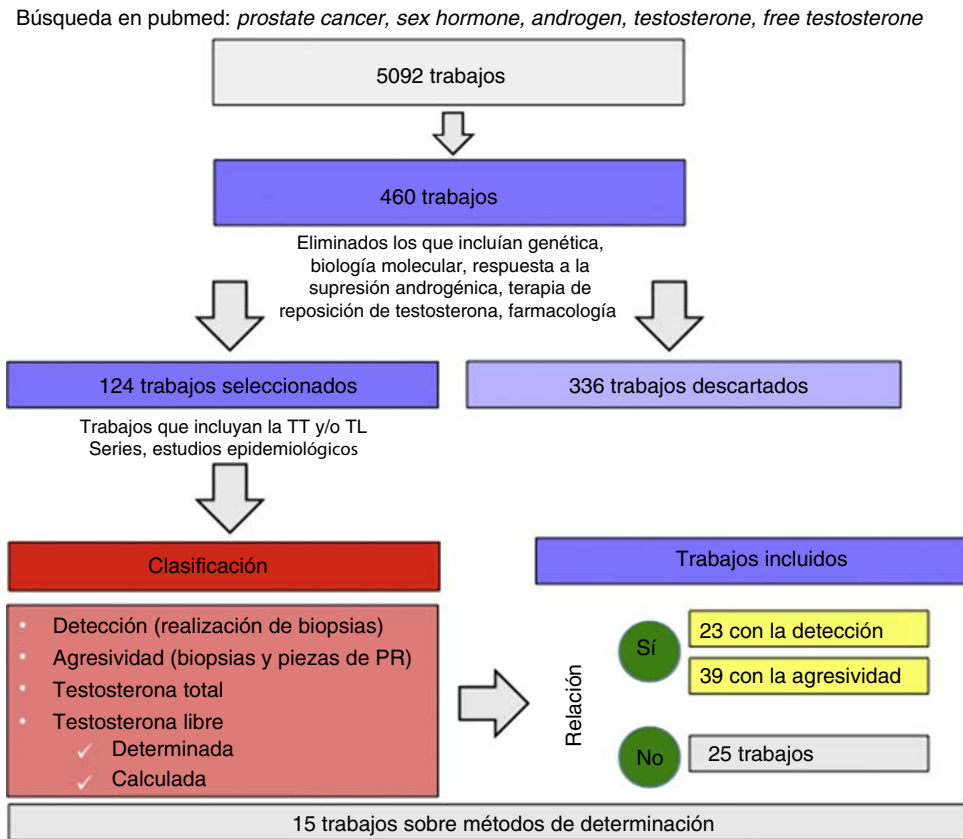


Figura 1 Diagrama del proceso de selección de los trabajos científicos.
PR: prostatectomía radical; TL: testosterona libre; TT: testosterona total.

44% de la TT está ligada con alta afinidad a la SHBG, y por ello no está disponible para unirse al receptor androgénico. Algo más del 50% está unida a la albúmina con baja afinidad, significando ello que en determinadas circunstancias

puede pasar fácilmente a la forma libre. Solo entre el 1% y 2% de la TT en suero está en forma libre y constituye la isoforma biológicamente activa, capaz de difundir hacia el citoplasma celular y unirse a su receptor específico, una vez

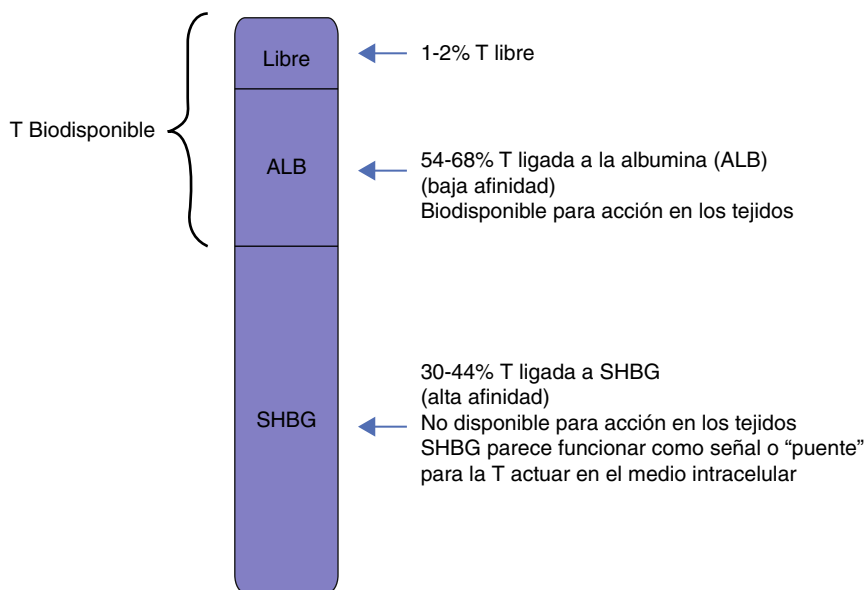


Figura 2 Distribución de la testosterona en sangre.
SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales (*Sex Hormone Binding Globulin*); T: testosterona.

transformada en DHT por acción de la 5-alfa-reductasa. La suma de la fracción de testosterona ligada de manera reversible a la albúmina y la TL constituye la fracción de testosterona biodisponible (TB)^{5,6}. La distribución y nomenclatura de las distintas fracciones de testosterona en suero se representa en la [figura 2](#).

Cuantificación de los niveles de testosterona

Con el tiempo los métodos de cuantificación de TT han mejorado su sensibilidad. Sin embargo, siguen teniendo una variabilidad inter-ensayo e intra-ensayo considerables, especialmente cuando se cuantifican niveles bajos. Los intervalos de referencia de la TT en suero son amplios y el ritmo circadiano de su secreción y la edad son factores determinantes en esta amplitud⁷. La Sociedad Americana de Endocrinología (SAE), con el objetivo de estandarizar los métodos de cuantificación de TT, recomienda la determinación en 3 días distintos, entre las 8 y las 10 de la mañana⁷.

A finales de los 60 la técnica derivada de la doble dilución isotópica asociada a reacciones orgánicas de extracción y cromatografías reactivas permitió la determinación de testosterona en plasma⁸. En ese momento, aunque era una técnica laboriosa por la necesidad de rigurosas validaciones, permitía su determinación en muestras de sangre relativamente pequeñas⁵. No obstante, este método no permitía cuantificar concentraciones inferiores a 50 ng/dl⁹. El desarrollo de análisis competitivos de enlaces proteicos ha permitido la determinación simultánea de niveles de testosterona en numerosas muestras. En la década de los 70 la introducción del RIA permitió alcanzar una sensibilidad inferior a 1 ng/dl, con un coeficiente de variación intraensayo entre el 4% y 9%¹⁰.

Los métodos actuales para determinar TT, aun siendo menos sensibles que el RIA, requieren volúmenes de muestra inferiores, están muy automatizados y además no necesitan reacciones orgánicas de extracción o cromatografías previas⁵. En el estudio que permitió la aprobación de leuprorelide por la *Food and Drug Administration* de Estados Unidos en 1984, se estableció el nivel de castración en 50 ng/dl, nivel alcanzado por el 96% de los pacientes tratados con agonistas de la LHRH. Este comportamiento de la TT ha sido validado en estudios posteriores^{11,12}. En 1995 el inmunoanálisis automatizado con tecnología de quimioluminiscencia (CL) fue aprobado para su uso clínico. Esta técnica permite mayor precisión interna, un coeficiente de variación intraensayo entre el 6% y 9% y un nivel inferior de sensibilidad que oscila entre 10 y 20 ng/dl¹³. Actualmente el CL es el método más utilizado, ya que está completamente automatizado y no utiliza trazadores radiactivos. Más recientemente, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS-MS) ha permitido incrementar la sensibilidad, por ello es especialmente útil cuando se analizan poblaciones con niveles bajos de TT como mujeres, niños y hombres con hipogonadismo. La LC/MS-MS permite detectar concentraciones hasta de 2 ng/dl¹⁴, con un coeficiente de variación intra-ensayo inferior al del RIA y del CL. Actualmente la LC/MS-MS sería el método más adecuado para determinar TT en pacientes sometidos a supresión androgénica. La gran desventaja de esta técnica es su falta de automatización completa^{6,7}.

Para determinar TL inicialmente se emplearon los métodos que utilizaban el equilibrio de diálisis, diferencia entre el peso molecular de las fracciones de la hormona. Posteriormente, la porción libre era separada y cuantificada por método directo o indirecto¹⁵. Los métodos indirectos requerían el uso de trazadores radiactivos y la cuantificación directa se obtenía multiplicando el porcentaje de radiactividad de la muestra dializada por el nivel de TT de la muestra. Sus resultados eran, por tanto, altamente dependientes de la exactitud de la cuantificación de TT¹⁵. Los métodos directos suelen utilizar RIA sin precisar cálculos a partir de la concentración de TT. La detección directa de TL en la muestra dializada a partir del RIA es altamente sensible. Sin embargo, la presencia de impurezas radioquímicas que no se unen a la SHBG o a la albúmina pueden dar resultados falsamente elevados, aunque el mayor inconveniente de este método es el elevado consumo de tiempo para su realización¹⁵. El método de ultrafiltrado también es considerado de referencia, y requiere menor tiempo de ejecución. No obstante, no es utilizado habitualmente al no estar automatizado¹⁶. El método de inmunoanálisis por análogo puede ser automatizado y se basa en principios de competitividad entre un análogo de la TT y la TL. No obstante, tiene un elevado coeficiente de variabilidad intra-ensayo, y por ello no se utiliza de forma habitual¹⁵. Los valores de TB también pueden ser medidos a partir de precipitación proteica selectiva de la testosterona ligada a la SHBG mediante reacciones con sulfato de amonio. La TB presente en el sobrenadante puede ser entonces cuantificada por técnicas directas o indirectas. Estos métodos presentan las mismas limitaciones que el equilibrio de diálisis y el ultrafiltrado¹⁶. Con el objetivo de superar estas limitaciones se establecieron algoritmos matemáticos para estimar sus valores. Los cálculos estimados a partir de la fracción de TL han sido descritos, aunque su uso no está recomendado por la falta de validación en humanos. Según Vermeulen et al. la TL y la TB pueden ser calculadas de acuerdo con la ley de masas¹⁷. Estos autores demostraron equivalencia entre los niveles de TL y TB calculadas y sus concentraciones determinadas mediante equilibrio de diálisis. Actualmente la estimación de TL es la recomendada debido a su simplicidad¹⁷. Sin embargo, los métodos estimativos tienen una alta dependencia de la determinación de TT, SHBG y albúmina. Además, variaciones en el índice de masa corporal y en la concentración de proteínas plasmáticas pueden alterar los resultados estimados. Cuando los niveles de testosterona son bajos las estimaciones de TB y TL son todavía más imprecisas y además no existen intervalos de referencia estandarizados¹⁵. Recientemente, la LC-MS/MS ha sido utilizada para determinar valores de TL con alta sensibilidad, lo que permitiría su uso en pacientes con hipogonadismo. Por ello, probablemente esta sería la técnica de elección para determinar la TL¹⁸.

Testosterona y riesgo de cáncer de próstata

La relación directa entre TT y carcinogénesis prostática ha sido denominada hipótesis androgénica, y surgió a partir de las publicaciones realizadas por Huggins y Hodges en los años 40. Los autores evidenciaron la regresión del CP diseminado tras la castración y la progresión al administrar testosterona². Diversos autores han estudiado la relación

Tabla 1 Principales estudios que encontraron asociación entre testosterona total y/o testosterona libre y un aumento del riesgo de cáncer de próstata

Autor (año)	Diseño del estudio	Hallazgos
Gann PH et al. (1996)	Casos y controles	Niveles elevados de TT
Rivera P et al. (2003)	Longitudinal	Niveles bajos de TT y TL
Stattin P et al. (2004)	Casos y controles	Niveles bajos de TT
Morgentaler A et al. (2006) ²⁵	Longitudinal	Niveles bajos de TT y TL
Sofikerim M et al. (2007) ²⁰	Longitudinal	Niveles bajos de TT y TL
Yano M et al. (2007)	Longitudinal	Niveles elevados de TT
Mearini L et al. (2008)	Casos y controles	Niveles bajos de TT
Rhoden EL et al. (2008)	Longitudinal	Valores bajos de la relación TT/PSA
Grossman H et al. (2010)	Casos y controles	Niveles elevados de TL y TB
Shin BS et al. (2010)	Casos y controles	Niveles bajos de TT
Ahmadi H et al. (2011)	Casos y controles	Niveles bajos de TT y TL
García-Cruz et al. (2012) ²³	Longitudinal	En hombres hipogonádicos, niveles bajos de TT
Muller RL et al. (2012)	Longitudinal	En hombres hipogonádicos, niveles elevados de TT
Hyde Z et al. (2012) ²¹	Longitudinal	Niveles elevados de TL
García-Cruz et al. (2013)	Longitudinal	Niveles bajos de TB
Mearini L et al. (2013) ²⁴	Casos y controles	Niveles bajos de TT

TT: testosterona total; TL: testosterona libre; TB: testosterona biodisponible.

entre riesgo de CP y testosterona (tabla 1). En el año 2000 se publicó un metaanálisis que incorporó 3 estudios, con un total de 1.112 varones de los cuales en 483 fueron diagnosticados de CP. Después del ajuste de los niveles de TT a los de otras hormonas, edad e índice de masa corporal, los autores concluyeron que los varones con niveles séricos de TT situados en el cuartil superior de la población analizada tenían un riesgo doble de desarrollar CP¹⁹. En 2007 Yano et al. estudiaron los niveles de TT en 420 varones sometidos a biopsia prostática por sospecha de CP, sin encontrar relación entre los niveles de TT y la detección de CP. Sin embargo, en el grupo de 207 pacientes cuyo PSA era inferior a 10 ng/ml se observó un nivel de TT significativamente superior cuando se detectó CP, siendo este un factor predictor independiente en el análisis multivariante²⁰. Hyde et al., en 2012, en el contexto del estudio *Prostate, Lung, Colorectal Cancer* analizaron una población de 3.635 varones, con edades entre 70 y 88 años, seguidos durante un periodo de 7 años, durante el cual se diagnosticaron 297 CP. Los autores no encontraron una asociación entre el riesgo de CP y los niveles de TT, sin embargo encontraron un incremento del 9% en el riesgo de detección de CP por cada incremento de una desviación estándar del nivel global de TL calculada²¹.

Otros estudios han sugerido que el CP se asocia a niveles bajos de testosterona^{22,23}.

En un reciente estudio publicado en 2013, que analizó 206 pacientes sometidos a biopsia prostática, se observó que los pacientes con un nivel sérico de TT inferior a 240 ng/ml tuvieron un riesgo superior de ser diagnosticados de CP²⁴. En 2006 Morgentaler et al. estudiaron una población de 345 hombres con hipogonadismo y niveles de PSA por debajo de 4 ng/ml, en la que detectaron CP en el 15%. Después de dicotomizar los niveles de TT por debajo y por encima de 250 ng/dl encontraron unas tasas de detección de CP del 21% y 12% respectivamente. Los autores también dicotomizaron los niveles de TL, determinados por RIA, por debajo y por encima de 1,0 ng/dl y las tasas de CP fueron del 20% y

12% respectivamente. La conclusión de este estudio fue que en pacientes hipogonadales con niveles bajos de PSA existe mayor riesgo de detección de CP cuanto más reducidos son los niveles de TT y de TL determinada²⁵.

Finalmente, existe otro grupo de estudios en los que no ha sido posible encontrar una relación entre los niveles séricos de TT y/o TL y el riesgo de CP^{26,27} (tabla 2). Entre ellos, un metaanálisis realizado en 2008 que incluyó 18 estudios con un total de 3.886 casos y 6.438 controles. Sus autores concluyeron que no era posible establecer una correlación entre los niveles séricos de distintas hormonas esteroideas analizadas y el riesgo de CP. En 10 de estos estudios se analizó TT y TL calculada, y los autores argumentan que la ausencia de relación entre diagnóstico de CP y niveles de TT y TL podría deberse a la falta de correlación entre la concentración de DHT intraprostática y los niveles séricos de TT y TL. En este mismo metaanálisis se encontró una relación inversa entre la concentración sérica de SHBG y el riesgo de CP. El riesgo relativo de CP se redujo un 14% al comparar los varones cuyo nivel de SHBG estuvo por debajo del percentil 20 y por encima del percentil 80²⁷.

Es difícil de entender la dispersión de los resultados expuestos previamente. Podríamos argumentar que solamente algunos estudios consideran las variaciones diurnas de testosterona y especifican cuándo se obtuvieron las muestras. Un único estudio que analizó sus resultados en función de la raza, la edad y el momento de obtención de la muestra no encontró relación entre el riesgo de CP y los niveles séricos de TT²⁸. También es conocido que la variabilidad individual de los niveles séricos de TT supera el 10%, obteniendo muestras en la misma hora y en días consecutivos²⁹.

Testosterona y agresividad tumoral

La predicción de la agresividad tumoral a partir de los niveles séricos de testosterona ha sido investigada ampliamente (tabla 3). Algunos estudios han asociado niveles elevados de

Tabla 2 Principales estudios que no encontraron asociación entre el riesgo de cáncer de próstata o la agresividad y testosterona total y/o testosterona libre

Autor (año)	Diseño del estudio	Hallazgos
Vatten LJ et al. (1997)	Casos y controles	Ausencia de asociación entre la TT y el riesgo de CP
Mohr BA et al. (2001)	Longitudinal	Ausencia de asociación entre la TT y el riesgo de CP
Kaaks R et al. (2003)	Longitudinal	Ausencia de asociación entre la TT y la TL y el riesgo de CP
Tsai CJ et al. (2006)	Longitudinal	Ausencia de asociación entre la TT y el riesgo de CP o su agresividad
Travis RC et al. (2007)	Longitudinal	Ausencia de asociación entre la TT/PSA y el riesgo de CP o su agresividad
Wirén S et al. (2007)	Longitudinal	Ausencia de asociación entre la TT y TL y el riesgo de CP o su agresividad
Weiss JM et al. (2008)	Longitudinal	Ausencia de asociación entre la TT y la TL y el riesgo de CP
Sher DJ et al. (2009)	Longitudinal	Ausencia de asociación entre la TT y TL y el riesgo de CP o su agresividad
Morote et al. (2009) ²⁶	Casos y controles	Ausencia de asociación entre la TT y la TL y el riesgo de CP o su agresividad
Morote et al. (2010)	Casos y controles	Ausencia de asociación entre la TT/PSA y el riesgo de CP
Koo JM et al. (2010)	Casos y controles	Ausencia de asociación entre la TT y el riesgo de CP o su agresividad
Gill JK et al. (2010) ²⁸	Casos y controles	Ausencia de asociación entre la TT y el riesgo de CP o su agresividad
Daniels NA et al. (2010)	Longitudinal	Ausencia de asociación entre la TT y el riesgo de CP
Sawada N et al. (2010)	Longitudinal	Ausencia de asociación entre la TT y TL y el riesgo de CP
Salonia A et al. (2011) ³⁸	Longitudinal	Ausencia de asociación entre TT y agresividad
Salonia A et al. (2012)	Longitudinal	Ausencia de asociación entre TT y agresividad
Waldert M et al. (2012)	Longitudinal	Ausencia de asociación entre la TT y TL y el riesgo de CP o su agresividad
Botelho F et al. (2012)	Longitudinal	Ausencia de asociación entre la TT y TL y el riesgo de CP o su agresividad
García-Cruz E et al. (2013)	Longitudinal	Ausencia de asociación entre TT y agresividad
Gershman B et al. (2014) ⁴²	Longitudinal	Ausencia de relación entre TT y mortalidad cáncer-específica o progresión metastásica

TT: testosterona total; TL: testosterona libre.

testosterona a mayor agresividad tumoral. En uno, publicado en 2014, Porcaro et al. analizaron los niveles séricos de TT y TL determinada en 220 pacientes sometidos a PR, de los cuales el 12% tuvo un CP de alto grado ([CPAG] suma de Gleason 8-10). Los autores observaron un riesgo de CPAG 5 veces mayor cuando el nivel de TT fue superior a 445 ng/dl, valor que representó la media de todo el grupo. En el análisis multivariante la concentración de TT, PSA y la suma de Gleason de la biopsia fueron predictores independientes de CPAG, y no los niveles de TL³⁰. Salonia et al. en 2013 estudiaron una cohorte de 605 pacientes sometidos a PR seguidos durante un periodo medio de 2 años en la que observaron una tasa de recidiva bioquímica (RB) (PSA \geq 0,1 ng/ml) en el 5,6% de los pacientes. En el análisis multivariante el nivel sérico de TT preoperatorio se comportó como un factor predictor independiente de la RB, al igual que los niveles de estradiol, SHBG y la suma de Gleason en la biopsia³¹.

Contrariamente, en otros estudios se ha sugerido que niveles inferiores de testosterona estarían relacionados con tumores más agresivos. En el año 2000 Hoffman et al. analizaron los niveles séricos de TT y TL determinada en 117 pacientes con CP, 57 de ellos sometidos a PR. Los autores concluyeron que únicamente los pacientes con niveles de TL inferiores a 1,5 ng/dl tuvieron una tendencia a tener una

enfermedad más extensa y mayor proporción de CPAG³². Zhang et al. analizaron 164 pacientes y encontraron niveles de TT y TL determinada significativamente inferiores en el grupo de pacientes con CPAG³³. En el año 2003 Massengill et al. encontraron niveles inferiores de TT en pacientes con enfermedad extraprostática. Sin embargo, la TT no fue un predictor independiente de RB³⁴. En 2005 Platz et al., en 460 pacientes diagnosticados de CP, encontraron niveles séricos de TT y TL determinada inversamente asociados a CPAG³⁵. En 2005 Teloken et al. en una serie de 64 pacientes sometidos a PR observaron una tasa márgenes positivos del 39% cuando el nivel de TT fue inferior a 270 ng/dl, frente al 15% cuando el nivel fue superior³⁶. En 2007, en un estudio similar realizado en 227 pacientes, Yamamoto et al. observaron que los pacientes con TT superior a 300 ng/dl tuvieron una supervivencia libre de RB del 85% frente al 68% de los pacientes con TT inferior a 300 ng/dl³⁷. En 2011 Salonia et al. analizaron los niveles de TT preoperatorios en una serie 673 pacientes sometidos a PR con el objetivo de evaluar la relación entre hipogonadismo, definido por una TT inferior a 300 ng/dl y la enfermedad de alto riesgo definida por la extensión extracapsular, invasión de vesículas seminales y suma de Gleason superior a 7. Los autores encontraron que solamente los pacientes con

Tabla 3 Principales estudios que encontraron asociación entre la agresividad del cáncer de próstata y testosterona total y/o testosterona libre

Autor (año)	Diseño del estudio	Hallazgos
Hoffman A et al. (2000) ³²	Casos y controles	Niveles bajos de TL se asociaron a tumores de alto grado y a mayor número de cilindros afectos
Schatzl G et al. (2001) ²²	Casos y controles	Niveles bajos de TT se asociaron a tumores de alto grado
Zhang PL et al. (2002) ³³	Casos y controles	Niveles bajos de TT y TL se asociaron a tumores de alto grado
Massengill JC et al. (2003) ³⁴	Casos y controles	Niveles bajos de TT se asociaron a enfermedad localmente avanzada
Platz EA et al. (2005) ³⁵	Casos y controles	Niveles bajos de TT se asociaron a tumores de alto grado
Imamoto T et al. (2005)	Casos y controles	Niveles bajos de TT se asociaron a enfermedad extraprostática
Teloken C et al. (2005) ³⁶	Casos y controles	Niveles bajos de TT se asociaron a la presencia de márgenes positivos
Isom-Batz G et al. (2005)	Casos y controles	Niveles bajos de TT se asociaron a tumores de alto grado
San Francisco IF et al. (2006)	Casos y controles	Niveles bajos de TL se asociaron a tumores de alto grado
Severi G et al. (2006)	Longitudinal	Niveles elevados de TT se asociaron a tumores más agresivos
Yamamoto S et al. (2007) ³⁷	Casos y controles	Niveles bajos de TT se asociaron a mayor recidiva bioquímica, márgenes positivos y tumores de alto grado
Sekine Y et al. (2007)	Casos y controles	Niveles bajos de TT se asociaron a tumores de alto grado
Ide H et al. (2008)	Longitudinal	Niveles bajos de TT se asociaron a tumores de alto grado
Kiellman A et al. (2008)	Longitudinal	Niveles bajos de DHT se asociaron a menor supervivencia cáncer específica
Lane BR et al. (2008)	Longitudinal	Niveles bajos de TT se asociaron a tumores de alto grado
Imamoto T et al. (2009)	Casos y controles	Niveles bajos de TT se asociaron a enfermedad extraprostática
Porcaro AB et al. (2010)	Casos y controles	La relación PSA/TL se asoció a tumores de alto grado y localmente avanzados
Pierorazio PM et al. (2010)	Longitudinal	Niveles elevados de TL se asociaron con tumores de alto grado en hombres mayores de 65 años
Xylinas E et al. (2011) ³	Casos y controles	Niveles bajos de TT se asociaron a enfermedad extraprostática
Botto H et al. (2011)	Longitudinal	Niveles bajos de TT se asociaron a tumores de alto grado
Kratzick C et al. (2011)	Casos y controles	Niveles bajos de TT se asociaron a afectación adenopática
Porcaro AB et al. (2012)	Casos y controles	Identificó la TT como factor predictor independiente de tumores de alto grado
Alsharif MM et al. (2012)	Casos y controles	Niveles bajos de TL se asociaron a tumores de alto grado
Albisini S et al. (2012)	Longitudinal	Niveles elevados de %TL (ratio entre testosterona libre y testosterona total) se asociaron a tumores de alto grado
Dai B et al. (2012)	Longitudinal	Niveles bajos de TT se asociaron a tumores de alto grado
García-Cruz E et al. (2012)	Longitudinal	Niveles elevados de TT se asociaron a menor número de tumores de bajo riesgo de D'Amico y niveles bajos de TT se asociaron a bilateralidad del tumor y un mayor número de cilindros afectos
Roder MA et al. (2012)	Longitudinal	Niveles bajos de TT se asociaron a recidiva bioquímica
Salonia A et al. (2012) ³⁹	Longitudinal	Valores extremos de TT (altos y bajos) se asociaron a tumores de alto riesgo de D'Amico
Salonia A et al. (2013) ³¹	Longitudinal	Identificó la TT como factor predictor independiente de recidiva bioquímica
Porcaro AB et al. (2013)	Casos y controles	Identificó la TT como factor predictor independiente de tumores de alto grado
Schnoeller T et al. (2013)	Longitudinal	Niveles bajos de TL se asociaron a tumores de alto grado, enfermedad localmente avanzada y con afectación adenopática
Porcaro A et al. (2014) ³⁰	Casos y controles	Niveles elevados de TT se asociaron a tumores de alto grado
León P et al. (2015)	Longitudinal	Niveles bajos de TT, TL y TB se asociaron a tumores de alto grado

DHT: dihidro-testosterona; TB: testosterona biodisponible; TL: testosterona libre; TT: testosterona total.

hipogonadismo severo, definido por un nivel de TT inferior a 100 ng/dl, tuvieron un riesgo 3 veces superior de tener afectación de vesículas seminales³⁸. En otra publicación, Salonia et al. en 2012 vuelven a estudiar la relación entre TT y CP de alto riesgo. Después de analizar algunos modelos en su análisis multivariante, establecieron que la probabilidad de tener un CP de alto riesgo aumentaba cuando los niveles de TT eran extremos, tanto reducidos como aumentados. Esta observación generó la formulación de una nueva hipótesis, alternativa a la hipótesis androgénica, en la cual se establecía un modelo de comportamiento no lineal³⁹.

Algunos autores han promovido la idea de que la asociación entre la agresividad del CP y el nivel sérico de testosterona podría ser consecuencia de cambios hormonales inducidos por otras comorbilidades ajenas al CP en el propio paciente³³. También se ha sugerido la acción inhibitoria de los CPAG sobre los niveles séricos de testosterona³⁴, la inhibición central del eje hipotalámico-hipofisario⁴⁰, la selección de clones celulares pobremente diferenciados en un ambiente de bajos niveles de testosterona y la combinación de algunos de los factores anteriores⁴¹.

En otros estudios no se ha encontrado una asociación entre la agresividad tumoral y los niveles séricos de testosterona^{28,42} (tabla 2). Uno reciente y amplio incluyó 73.600 varones procedentes del *Health Professionals Follow-up study* y del *Physicians Health Study* seguidos durante un periodo de 12 años, durante el cual se diagnosticaron 963 pacientes de CP. Los autores no encontraron asociación alguna entre los niveles séricos de TT y TL determinada y el CP letal, definido a partir del desarrollo de metástasis y/o mortalidad cáncer-específica⁴².

Nuevamente en este apartado encontramos datos contradictorios difíciles de interpretar. Algunos estudios se han realizado sobre muestras insuficientes y muchos sobre series retrospectivas. Además, no existe uniformidad entre los métodos utilizados para cuantificar TT y TL. En pocos estudios se especifica el horario de recogida de las muestras. Cuando se analiza, la definición de estado hipogonadal tampoco es uniforme. Casi nunca se han tenido en cuenta las variaciones individuales y en pocos estudios se ha analizado el impacto de la raza de los pacientes. Por último, ningún estudio ha seguido la recomendación de la SAE para evaluar adecuadamente el nivel de testosterona en suero, que requiere la determinación en 3 días consecutivos entre las 8 y las 10 de la mañana⁷. En general, los niveles séricos de TT y TL tienen alta variabilidad debido a su secreción pulsátil y circadiana, se relacionan con la edad, con la ingesta de glucosa, con los niveles de triglicéridos, la administración de ciertos fármacos y también la manipulación de las muestras⁴³.

En esta revisión se ha descrito la hipótesis androgénica, generada a partir de los estudios de Huggins, y que de manera resumida sugiere que a más testosterona mayor probabilidad de CP y mayor agresividad². También hemos citado la reciente hipótesis formulada por Salonia et al., que sugiere que el riesgo de CP y su agresividad estarían relacionados con niveles extremos de testosterona sérica, de manera que se incrementaría de manera similar con valores extremos, tanto altos como bajos³¹. Finalmente, la hipótesis basada en el modelo de saturación, descrita por Morgentaler y Traish, es la actualmente la más aceptada.

En esta hipótesis los autores definen la influencia de los niveles séricos de testosterona sobre el riesgo y agresividad del CP por debajo de un determinado nivel, a partir del cual se estima que habría una saturación del modelo y la concentración de testosterona no se relacionaría⁴⁴. En nuestra opinión, y teniendo en cuenta las limitaciones anteriormente explicadas, no hemos encontrado en la literatura datos que soporten de manera fiable ninguna de las teorías descritas.

Conclusiones

La relación entre los niveles séricos de testosterona y riesgo de CP y su agresividad ha sido ampliamente estudiada. Los datos publicados son muy contradictorios y esta dispersión en los resultados ha llevado a formular 3 hipótesis completamente distintas que permitirían relacionar los niveles de testosterona sérica con la carcinogénesis prostática. No obstante, el análisis de los estudios más relevantes no permite evidenciar que ninguna de ellas sea cierta. Desde el punto de vista práctico, el análisis de los datos actuales no permite recomendar la determinación de TT y/o TL para establecer el riesgo de CP, y poder tomar determinaciones respecto a la necesidad de biopsiar o rebiopsiar un paciente con sospecha de CP y/o estimar su agresividad.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol*. 2012;61:1079–92.
2. Huggins C, Clark PJ. Quantitative studies of prostatic secretion: The effect of castration and of estrogen injection on the normal and on the hyperplastic prostate glands of dogs. *J Exp Med*. 1940;72:747–62.
3. Xylinas E, Ploussard G, Durand X, Fabre A, Salomon L, Allory Y, et al. Low pretreatment total testosterone (< 3 ng/ml) predicts extraprostatic disease in prostatectomy specimens from patients with preoperative localized prostate cancer. *BJU Int*. 2011;107:1400–3.
4. Schulman CC, Irani J, Morote J, Schalken JA, Montorsi F, Chlosta PL, et al. Testosterone measurement in patients with prostate cancer. *Eur Urol*. 2010;58:65–74.
5. Matsumoto AM, Bremner WJ. Serum testosterone assays-accuracy matters. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:520–4.
6. Rove KO, Debruyne FM, Djavan B, Gomella LG, Koul HK, Lucia MS, et al. Role of testosterone in managing advanced prostate cancer. *Urology*. 2012;80:754–62.
7. Rosner W, Vesper H. Toward excellence in testosterone testing: A consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:4542–8.
8. Burger HG, Kent JR, Kellie AE. Determination of testosterone in human peripheral and adrenal venous plasma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1964;24:432–41.
9. Wilke TJ, Utley DJ. Total testosterone: Free-androgen index, calculated free testosterone, and free testosterone by analysis compared in hirsute women and in otherwise-normal

- women with altered binding of sex-hormone-binding globulin. *Clin Chem.* 1987;33:1372-5.
10. Furuyama S, Mayes DM, Nugent CA. A radioimmunoassay for plasma testosterone. *Steroids.* 1970;16:415-28.
 11. The leuprolide study group. Leuprolide versus diethylstilbestrol for metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.* 1984;311:1281-6.
 12. Sharifi R, Soloway M. Clinical study of leuprolide depot formulation in the treatment of advanced prostate cancer. The leuprolide study group. *J Urol.* 1990;143:68-71.
 13. Wheeler MJ, D'souza A, Matadeen J, Croos P. Ciba corning acs:180 testosterone assay evaluated. *Clin Chem.* 1996;42:1445-9.
 14. Yokokawa A, Yamamoto K, Omori Y, Shibasaki H, Shinohara Y, Kasuya Y, et al. Simultaneous determination of androstenedione: 11beta-hydroxyandrostenedione, and testosterone in human plasma by stable isotope dilution mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009;877:621-6.
 15. Shea JL, Wongt PY, Chen Y. Free testosterone: Clinical utility and important analytical aspects of measurement. *Adv Clin Chem.* 2014;63:59-84.
 16. Green PJ, Yucis MJ. Free-testosterone determination by ultrafiltration: And comparison with dialysis. *Clin Chem.* 1982;28:1237-8.
 17. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:3666-72.
 18. Chen Y, Yazdanpanah M, Hoffman BR, Diamandis EP, Wong PY. Rapid determination of serum testosterone by liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry and a split sample comparison with three automated immunoassays. *Clin Biochem.* 2009;42:484-90.
 19. Shaneyfelt T, Husein R, Bubley G, Mantzoros CS. Hormonal predictors of prostate cancer: A meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2000;18:847-53.
 20. Yano M, Imamoto T, Suzuki H, Fukasawa S, Kojima S, Komiya A, et al. The clinical potential of pretreatment serum testosterone level to improve the efficiency of prostate cancer screening. *Eur Urol.* 2007;51:375-80.
 21. Hyde Z, Flicker L, Mccaul KA, Almeida OP, Hankey GJ, Chubb SA, et al. Associations between testosterone levels and incident prostate: lung, and colorectal cancer. A population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012;21:1319-29.
 22. Schatzl G, Madersbacher S, Thurnid T, Waldmuller J, Kramer G, Haitel A, et al. High-grade prostate cancer is associated with low serum testosterone levels. *Prostate.* 2001;47:52-8.
 23. Garcia-Cruz E, Huguet J, Piqueras M, Marquez MP, Peri L, Izquierdo L, et al. Low testosterone bioavailability is related to prostate cancer diagnose in patients submitted to prostate biopsy. *World J Urol.* 2012;30:361-5.
 24. Mearini L, Zucchi A, Nunzi E, Villirillo T, Bini V, Porena M. Low serum testosterone levels are predictive of prostate cancer. *World J Urol.* 2013;31:247-52.
 25. Morgentaler A, Rhoden EL. Prevalence of prostate cancer among hypogonadal men with prostate-specific antigen levels of 4.0 ng/ml or less. *Urology.* 2006;68:1263-7.
 26. Morote J, Ramirez C, Gomez E, Planas J, Raventos CX, de Torres IM, et al. The relationship between total and free serum testosterone and the risk of prostate cancer and tumour aggressiveness. *BJU Int.* 2009;104:486-9.
 27. Roddam AW, Allen NE, Appleby P, Key TJ. Endogenous sex hormones and prostate cancer: A collaborative analysis of 18 prospective studies. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:170-83.
 28. Gill JK, Wilkens LR, Pollak MN, Stanczyk FZ, Kolonel LN. Androgens, growth factors, and risk of prostate cancer: The multiethnic cohort. *Prostate.* 2010;70:906-15.
 29. Brambilla DJ, O'donnell AB, Matsumoto AM, Mckinlay JB. Intraindividual variation in levels of serum testosterone and other reproductive and adrenal hormones in men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;67:853-62.
 30. Porcaro AB, Petrozziello A, Ghimenton C, Migliorini F, Sava T, Caruso B, et al. Associations of pretreatment serum total testosterone measurements with pathology-detected gleason score cancer. *Urol Int.* 2014;93:269-78.
 31. Salonia A, Abdollah F, Capitanio U, Gallina A, Suardi N, Briganti A, et al. Preoperative sex steroids are significant predictors of early biochemical recurrence after radical prostatectomy. *World J Urol.* 2013;31:275-80.
 32. Hoffman MA, Dewolf WC, Morgentaler A. Is low serum free testosterone a marker for high grade prostate cancer? *J Urol.* 2000;163:824-7.
 33. Zhang PL, Rosen S, Veeramachaneni R, Kao J, Dewolf WC, Bubley G. Association between prostate cancer and serum testosterone levels. *Prostate.* 2002;53:179-82.
 34. Massengill JC, Sun L, Moul JW, Wu H, Mcleod DG, Amling C, et al. Pretreatment total testosterone level predicts pathological stage in patients with localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol.* 2003;169:1670-5.
 35. Platz EA, Leitzmann MF, Rifai N, Kantoff PW, Chen YC, Stampfer MJ, et al. Sex steroid hormones and the androgen receptor gene cag repeat and subsequent risk of prostate cancer in the prostate-specific antigen era. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:1262-9.
 36. Teloken C, da Ros CT, Caraver F, Weber FA, Cavalheiro AP, Graziottin TM. Low serum testosterone levels are associated with positive surgical margins in radical retropubic prostatectomy: Hypogonadism represents bad prognosis in prostate cancer. *J Urol.* 2005;174:2178-80.
 37. Yamamoto S, Yonese J, Kawakami S, Ohkubo Y, Tatokoro M, Komai Y, et al. Preoperative serum testosterone level as an independent predictor of treatment failure following radical prostatectomy. *Eur Urol.* 2007;52:696-701.
 38. Salonia A, Gallina A, Briganti A, Abdollah F, Suardi N, Capitanio U, et al. Preoperative hypogonadism is not an independent predictor of high-risk disease in patients undergoing radical prostatectomy. *Cancer.* 2011;117:3953-62.
 39. Salonia A, Abdollah F, Capitanio U, Suardi N, Briganti A, Gallina A, et al. Serum sex steroids depict a nonlinear u-shaped association with high-risk prostate cancer at radical prostatectomy. *Clin Cancer Res.* 2012;18:3648-57.
 40. Iversen P, Rasmussen F, Christensen IJ. Serum testosterone as a prognostic factor in patients with advanced prostatic carcinoma. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 1994;157:41-7.
 41. Miller LR, Partin AW, Chan DW, Bruzek DJ, Dobs AS, Epstein JI, et al. Influence of radical prostatectomy on serum hormone levels. *J Urol.* 1998;160:449-53.
 42. Gershman B, Shui IM, Stampfer M, Platz EA, Gann PH, Sesso HL, et al. Prediagnostic circulating sex hormones are not associated with mortality for men with prostate cancer. *Eur Urol.* 2014;65:683-9.
 43. Raff H, Sluss PM. Pre-analytical issues for testosterone and estradiol assays. *Steroids.* 2008;73:1297-304.
 44. Morgentaler A, Traish AM. Shifting the paradigm of testosterone and prostate cancer: The saturation model and the limits of androgen-dependent growth. *Eur Urol.* 2009;55:310-20.

Determined Free Serum Testosterone is Better than Total Testosterone as a Predictor of Prostate Cancer Risk

Lucas Regis

Department of Urology, Vall d'Hebron
Hospital Barcelona, Spain
lregis@vhebron.net

Ana Celma

Department of Urology, Vall d'Hebron
Hospital Barcelona, Spain
Department of Surgery, Universitat Autònoma
de Barcelona Barcelona, Spain
acelma@vhebron.net

Jacques Planas

Department of Urology, Vall d'Hebron
Hospital Barcelona, Spain
Department of Surgery, Universitat Autònoma
de Barcelona Barcelona, Spain
jplanas@vhebron.net

Ines deTorres

Department of Pathology, Vall d'Hebron
Hospital Barcelona, Spain
Department of Surgery, Universitat Autònoma
de Barcelona Barcelona, Spain
itorres@vhebron.net

Roser Ferrer

Department of Biochemistry, Vall d'Hebron
Hospital Barcelona, Spain
Department of Surgery, Universitat Autònoma
de Barcelona Barcelona, Spain
roferrer@vhebron.net

Juan Morote

Department of Urology, Vall d'Hebron
Hospital Barcelona, Spain
Department of Surgery, Universitat Autònoma
de Barcelona Barcelona, Spain
jmorote@vhebron.net

Abstract: *Background: Circulating testosterone remains the main source of androgens, however only 1%-2% circulates as free testosterone (fT), hormone active form. To compare the performance of serum fT and total testosterone (tT) as predictors of prostate cancer (PCa) detection and aggressiveness.*

Methods: Serum fT (RIA, pg/mL) and tT (LC/MS, ng/dL) were prospectively determined in 3364 consecutive men with PCa suspicion scheduled to TRUS guided biopsy. Tumor aggressiveness was assessed by Gleason grade (8 to 10) and D'Amico risk (cT3a+ or PSA>20 ng/mL or Gleason 8 to 10). Recodification of fT and tT in four groups according to percentile (ptile) distribution were done. tT/1 (min to 10 ptile): 62-291 ng/dl, tT/2

(ptile 10.1 to 50): 291,1 to 451 ng/dl, tT/3 (ptile 50.1 to 90): 451,1 to 676 ng/dl, and tT/4 (ptile 90.1 to max): 676.1 to 1440 ng/dl. fT/1: 0,1 to 0,85, fT/2: 0,86 to 5.20, fT/3: 5,21 to 9.65, and fT/4: 9.66 to 18 pg/ml.

Results: PCa detection rates were for tT/1: 43.8%, tT/2: 40.6%, tT/3: 35.6%, and tT/4: 31.7%, $p=0.0001$. For fT/1: 48.0%, fT/2: 41.0%, fT/3: 34.8%, and fT/4: 28.6%, $p=0.0001$. Logistic regression analysis shown fT and tT as independent predictors of PCa detection, respectively $OR= 0.857$ (95%CI: 0.769-0.956), $p= 0.006$, and $OR= 0.792$ (95%CI: 0.709-0.883), $p=0.0001$.

Conclusions: Serum fT and tT were independent predictors of PCa detection. fT has better performance than tT to predict the PCa risk, but none of them were related to tumor aggressiveness.

Impact: Free testosterone could compose a nomogram to improve PCa detection.

Keywords: prostate cancer, serum testosterone, free testosterone, prediction, diagnosis.

1. INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the most common cancer in elderly males in Europe. The incidence is highest in Northern and Western Europe (> 200 per 100,000), while rates in Eastern and Southern Europe have showed a continuous increase [1]. For more than seventy years, it has been widely accepted that PCa growth is dependent on serum testosterone concentrations, based on experiments by Huggins et al. that castration caused PCa regression, whereas testosterone administration caused more rapid PCa growth [2]. Although from an epidemiological point of view, this relationship had been questioned in view of the fact that serum testosterone level decreases with age [3], while the prevalence of PCa increases substantially. Moreover, an association between circulating androgens and PCa has not been clearly confirmed in epidemiologic studies [4, 5].

Circulating testosterone remains the main source of androgens for PCa cells. Up to 95% of testosterone is produced by the Leydig cells in the testes in response to luteinizing hormone (LH) release from the anterior pituitary while the remainder of testosterone is derived from the adrenal glands [6]. However, these values largely reflect the concentration of testosterone bound to plasma proteins, including sex hormone binding globulin (SHBG) and albumin. About 30%-44% of total testosterone (tT) is bound to SHBG and it is considered to be unavailable for androgenic signaling. Only about 1%-2% circulates as free testosterone (fT), constituting the active form of the hormone able to diffuse into cells and bind to androgen receptors. This theory has been largely accepted as the free hormone hypothesis [7]. The remaining testosterone is loosely bound to albumin in a reversible fashion and may be biologically available in some tissues [8]. During the last few years some studies have reported an association of low serum testosterone levels with an increase in the risk of prostate cancer, more aggressive tumors and worse survival rates [9-14]. Most of the articles that failed to find a significant association between testosterone and risk of PCa and/or its aggressiveness assumed serum tT value as the main representation of the androgenic activity [15-17]. Alternatively, other authors have published the relationship of the active form of the hormone and PCa, as calculated fT [18-20], bioavailable testosterone (bT) [21] and a few of them using immunoassay determined fT [22]. We believe that "determined fT reflects better than tT the concentration of intraprostatic T" is a plausible hypothesis. The aim of this study was to compare the performance of serum determined fT and tT as predictors of PCa detection risk and tumor aggressiveness in a large cohort of patients eligible for transrectal ultrasound (TRUS) prostate biopsy.

2. PATIENTS AND METHODS

2.1 Patients

We prospectively determined serum tT and fT levels in 3364 consecutive men scheduled for a TRUS-guided biopsy of the prostate performed by an experienced urologist between January 2007 and June 2014. Biopsies were taken using an end-fire ultrasound transducer (Falcon 2101, B-K Medical Inc., Denmark) and an automatic 18-G needle. The criteria for prostate biopsy were an abnormal digital rectal examination (DRE) and/or a serum PSA level of > 4.0 ng/mL. Biopsy scheme included 10 cores plus 2 to 8 additional cores in the first 2518 procedures according to age and prostatic volume, and 12 cores thereafter. All biopsy cores were analyzed by an experienced uropathologist. Patients who were receiving LH-releasing hormone analogs, 5-ARI, testosterone replacement therapy or had previous prostate biopsy were excluded from the analysis. We prospectively recorded age, body mass index (BMI), total and free PSA, findings at DRE, prostate volume (PV), biopsy findings, Gleason scores,

Determined Free Serum Testosterone is Better than Total Testosterone as a Predictor of Prostate Cancer Risk

and clinical stage (TNM 2002). The study was carried out in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration II and approved by our institutional review board. Written informed consent was obtained from each patient before any study investigation was carried out.

2.2 Hormonal assays

Despite a trend toward aged-related reduction in peak serum testosterone concentration at dawn, all patients underwent systematic blood sampling between 7 AM and 10 AM one week before the day of the biopsy to assess tT as well as fT levels according to the Endocrine Society's guidelines [23]. Serum tT (241-827 ng/dL) was measured using a solid-phase, competitive chemiluminescent enzyme immunoassay (LC/MS), using the Immulite 2500 automated analyzer (DPC Inc., Los Angeles, CA, USA). Serum fT (8.9-42.5 pg/mL) was measured using an analogue ligand radioimmunoassay (RIA) (DPC, Inc., Los Angeles, CA, USA).

2.3 Study end points

The primary end points of this study were the PCa detection rate and tumor aggressiveness. Tumor aggressiveness was defined as Gleason score [24] of the biopsy (HG: high grade PCa, GS 8 to 10) and D'Amico risk classification (HR: high risk PCa, clinical stage cT3a+ or PSA>20 ng/ml or GS 8 to 10). We defined advanced PCa as local advanced PCa (T3-4), lymph node dissemination (N1-2) or metastatic dissemination (M1).

2.4 Statistical analyses

Variables such as age, BMI, total PSA and prostate volume were analyzed as continuous variables. DRE was analyzed as a categorical variable (normal versus suspicious). To define whether a hormonal pattern was related to PCa, recodification of fT and tT in four groups according to percentile (ptile) distribution were done. tT/1 (min to 10 ptile): 62-291 ng/dl, tT/2 (ptile 10.1 to 50): 291.1 to 451 ng/dl, tT/3 (ptile 50.1 to 90): 451.1 to 676 ng/dl, and tT/4 (ptile 90.1 to max): 676.1 to 1440 ng/dl. fT/1: 0.1 to 0.85, fT/2: 0.86 to 5.20, fT/3: 5.21 to 9.65, and fT/4: 9.66 to 18.0 pg/ml. The chi-squared test and the nonparametric Mann-Whitney U-test were used to relate qualitative and quantitative variables respectively. In the population study, first a univariate analysis of the clinical, biochemical, and hormonal variables related to the presence of PCa was performed. Those variables that achieved a statistical significance in the univariate analysis ($p < 0.05$) were selected for further multivariate analysis (binary logistic regression and forward stepwise conditional methods).

3. RESULTS

The median age of the 3364 patients was 68 years (range, 46-86), the rate of abnormal DRE was 20.3% (684), and the median PSA was 7.0 ng/ml (range, 0.6 to 1754). The overall PCa detection rate was 38.0% (1280). The median of serum tT and fT concentration was 451 ng/dL and 5.2 pg/dL respectively. 86.7% of PCa diagnosed patients were organ confined at diagnosis (T1-2 N0 M0) while 10.6% were locally advanced stage (T3-4 N0-2 M0). Only 2.7% of the cohort had metastasis at diagnosis. High-grade disease (Gleason score > 7 ; $n = 331$) was found in 25.9% of patients with positive biopsy. In addition, 33.2 % of patients with PCa was classified as high risk disease (adapted from D'Amico risk: cT3a+ or PSA>20 ng/mL or Gleason score 8 to 10; $n = 426$). Clinical, pathological, biochemical and hormonal data of the entire cohort are presented in table 1. In the univariate analysis, variables such as age, total PSA and finding of DRE were positively correlated with the presence of PCa while prostate volume, tT and fT had an inverse relation (table 2). BMI was not significantly related with PCa ($p > 0.05$).

Graphic representation of the distribution of tT and fT levels and the percentiles distribution of the population sample are shown in fig. 1.

Binary logistic regression analysis showed that both tT and fT were independent predictors of PCa detection. Low serum levels of tT (OR 0.857, 95%CI 0.769-0.956, $p < 0.001$) and fT (OR 0.792, 95% CI 0.709-0.883), $p < 0.001$) were significantly associated with PCa risk, as shown in table 3. Furthermore, total serum PSA and DRE were significant independent predictors of cancer.

The PCa detection rate according to tT and fT percentiles distribution is summarized in fig. 2. The ROC analysis for serum tT and fT to distinguish between PCa and benign prostatic conditions are presented in fig. 3. Considering all patients, the area under the curve (AUC) was higher for fT than for tT (0.571 versus 0.541, respectively).

The second aim of our study was to analyze the relationship between PCa aggressiveness and hormonal pattern. As reported in table 4, serum tT and fT were not statistically significant predictors neither of HGS (OR 1.153, 95%CI 0.966-1.376, $p = 0.115$; OR 0.903, CI95% 0.756-1.080, $p = 0.263$, respectively) nor HR (OR 1.058, 95%CI 0.871-1.284, $p = 0.572$; OR 1.184, CI95% 0.960-1.459, $p = 0.114$, respectively). Age, DRE and PSA were significant predictors of HR disease while age and PSA were also predictors of HGS ($p < 0.05$).

4. DISCUSSION

The aim of this study was to define a useful hormonal variable to help in detecting patients at risk of PCa. The authors conducted a retrospective study analyzing prostate biopsies from a third level health-care center in which a hormonal profile had been determined as part of a clinical protocol. The main finds of this study are that tT and fT were correlated with PCa. Those hormone parameters appeared to be helpful clinical markers to detect PCa, although this hormonal pattern achieved inaccurate results (fig. 3). A meta-analysis that incorporated 18 prospective studies did not find a relationship between testosterone, calculated free testosterone, dihydrotestosterone, dyhydroepiandrosterone sulfate, androstenedione, androstanediol glucuronide, oestradiol and calculated free oestradiol [25]. However, Roddam et al. found an inverse association between SHBG and PCa detection and, as reported in other published articles [21], it might suggest a role of the free or bioavailable hormone portion in increasing PCa risk [25].

Our group has previously analyzed the relationship between hormonal pattern and PCa risk [26-28]. To our knowledge, this is the largest prospective, consecutive single center study that has tried to identify a hormonal clinical marker, which contributes to PCa detection and prediction of its level of aggression. Previously, many studies had reported an association of low serum testosterone levels with PCa aggressiveness [9] [10-14]. Most of them failed to find a significant association between testosterone and risk of PCa and/or its aggressiveness and assumed serum tT value as the main representation of the androgenic activity [15-17, 29-31]. Daniels et al. analyzed a total of 1927 patients for a mean period of five years. These authors did not find any association between the diagnosis of PCa and tT serum levels [16]. As we know, it has been largely accepted that the biological activity of a given hormone is affected by its unbound (free) rather than protein-bound concentration plasma. Mendel et al. proposed this theory, called The Free Hormonal hypothesis, after mathematical and physiological hormonal model tests [7, 8]. Consequently, our group believes that determined fT is a better reflector/indicator of the concentration of intraprostatic testosterone than tT. Therefore, to study the real relationship between the hormonal pattern of testosterone and PCa, the free portion of the hormone must be determined.

Some authors have published the relationship of the active form of testosterone and PCa [18, 21, 32]. Grosman et al. found a positive correlation between the free androgen index (FAI), fT and bT and PCa in a cohort of 150 men scheduled for prostate biopsy [18]. Similarly, García-Cruz et al. studied 1000 men and found that calculated fT (using Vermeulen's formula) and bT were significantly associated with PCa detection [21]. To provide further support, Leon et al recently published that estimated fT and bT were significantly linked with high-grade PCa [20]. In contrast, there are published studies that have failed to achieve an association between estimated fT or bT and PCa [33-35]. In this present study, in order to verify the real relationship with PCa, determined fT (RIA) was incorporated into the clinical protocol evaluation, which is a more accurate method to represent the free androgen profile. It is well known that calculated fT is highly dependent on the accuracy and sensitivity of the tT and SHBG assays and that the FAI is no longer recommended due to poor correlation with reference methods in men [36]. Our results demonstrated that patients with low levels of determined fT and tT had an increased PCa risk as both were independent predictors of PCa detection. Furthermore, fT seems to be a better PCa detection marker than tT due to the fact that it has achieved a better performance with a more powerful trend: more PCa detection, less fT levels and it demonstrated more intense PCa rates changes inter percentiles groups (fig. 3, table 3). Rivera et al. published the results of a biopsies sample analysis showing that the average values of total and determined free testosterone were significantly smaller in patients with PCa [37], which supports the findings of our present study. Although, fT and tT serum profile probably have a limited clinical application, both tests achieved AUCs < 0.70 corresponding to diagnostic tests with poor accuracy (a test that discriminates benign from malignant pathologies will have an AUC of 1, while a unreliable test will have an AUC of 0.5) [38].

Determined Free Serum Testosterone is Better than Total Testosterone as a Predictor of Prostate Cancer Risk

The second aim of our study was to analyze the relationship of PCa aggressiveness and hormonal pattern. It has been hypothesized that PCa in a low testosterone environment may dedifferentiate and subsequently influence more undifferentiated and aggressive tumors given the fact that prostate cells grow in an environment lacking one of their most important activators, testosterone, which is reflected in higher Gleason score tumors [39]. Our data failed in achieve any association of testosterone, total or free portion, and high risk or high-grade tumors. Thus our study contrasts with some of those published within the last decade in which low testosterone levels seem to be linked to some aspects related to tumor aggressiveness: several studies claim that low testosterone levels might be related to poor clinical and pathological outcomes: high risk tumors [40, 41], high grade cancers [22, 42-44], advanced stage diseases [9, 45], positive surgical margins [10], worse prognosis and treatment response [46].

Published data are sometimes paradoxical. On one hand, testosterone deficiency is related to a poor prognosis in PCa while on the other hand, testosterone supplementation does not increase PCa risk. Testosterone is converted to the more androgenic DHT (by the action of 5 α -reductase) within the prostate but the proportion of prostate-produced DHT that reaches the serum has not been determined and the correlation between tT and fT serum levels and DHT has not been established. Hence, the relationship between the concentration of different androgen isoforms in serum and in the prostate is unclear and could explain the lack of an association between serum levels and prostate cancer aggressiveness. Our study is a daily practice experience and no inclusion or exclusion criteria were considered. Regarding blood collection and preservation, our laboratory followed ISA-ISSAM-EAU Guideline recommendations. Part of the contradictory results might be explained by these methodological differences.

Our study has some limitations. This pooled analysis relied on the measurement of serum hormone levels in only one sample at only one time. These single measurements provide an imperfect estimate of a man's usual hormonal status and can be influenced both by within-person errors and analytical errors. Both types of errors are likely to lead to attenuation of the relationship between hormone concentration and risk [47]. In addition, prostate cancers develop with aging, so the timing is highly relevant. Our results represent a single point biopsy and do not take into consideration the time factor in relation to the development of PCa. Another possible limitation of our study is that one biopsy outcome was used as the definitive diagnosis of the patient. However, there is still a small chance of missing a PCa in this procedure.

5. FIGURES AND TABLES

5.1 Figures

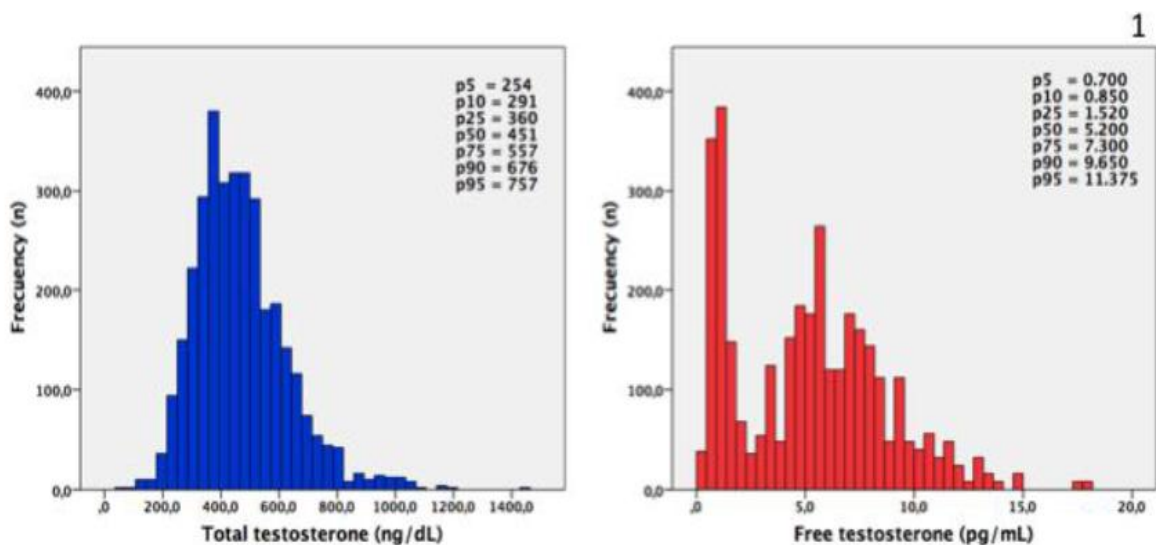


Figure 1. A. Total testosterone graphic and percentile distribution at the population sample. B. Free testosterone graphic and percentile distribution at the population sample.

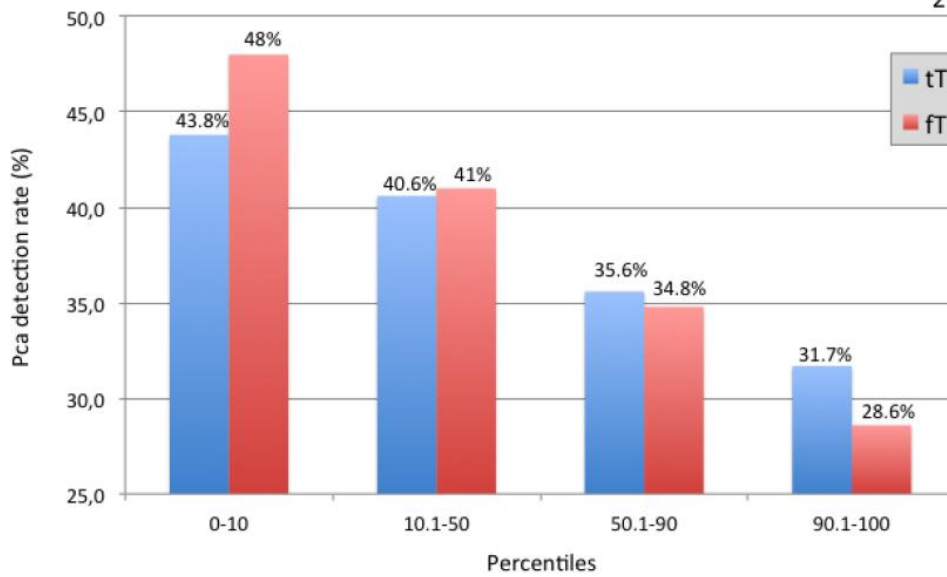


Figure2. Pca detection rate according to total and free testosterone percentiles distribution.

tT (ng/dL): p 0 - 10 = 0 to 291; p 10.1 - 50 = 292 to 451; p 50.1 - 90 = 452 to 676; p 90.1 - 100 = 677 to 1500. fT (pg/dL): p 0 - 10 = 0 to 0.850; p 10.1 - 50 = 0.851 to 5.200; p 50.1 - 90 = 5.201 to 9.650; p 90.1 - 100 = 9.651 to 20.

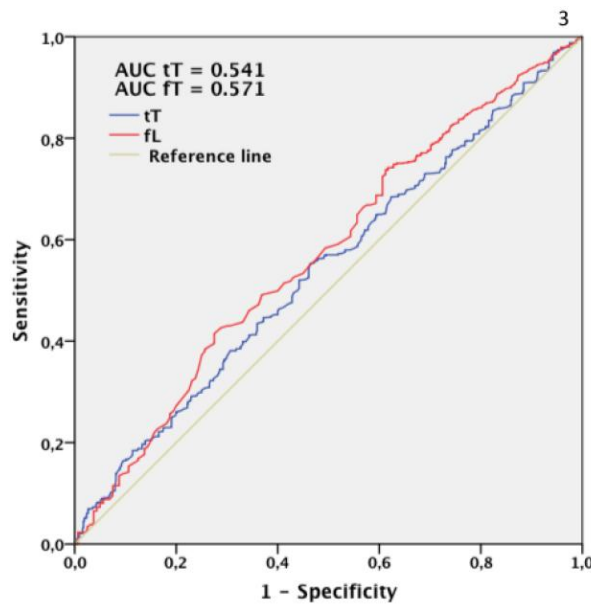


Figure3. Receiver operating characteristics (ROC) curve of total testosterone and free testosterone in relation of Pca detection. AUC: area under the curve; tT: total testosterone; fT: free testosterone

5.2 Tables

Table1. Demographic and clinical data of the population sample.

Men, no	3364
Age*, years	68 (46-86)
PSA*, ng/mL	7 (0.7-1724)
DRE, positive (%)	684 (20.3)
PV*, cm3	43.2 (7-159)
tT*, ng/dL	451 (62-1440)
fT*, pg/mL	5.2 (0.1-18)
Pca detection rate, no (%)	1280 (38%)
Clinical stage, no (%)	
T1-2 N0 M0	1110 (86.7)
T3-4 N0-2 M0	136 (10.6)

Determined Free Serum Testosterone is Better than Total Testosterone as a Predictor of Prostate Cancer Risk

T1-4 N0-1 M1	34 (2.7)
Biopsy Gleason score, no (%)	
6	380 (11.3)
7	569 (16.9)
8-10	331 (9.8)
PCa risk**, no (%)	
Low	272 (21.3)
Intermedium	582 (45.5)
High	426 (33.2)

DRE: digital rectal examination; PV: prostate volume; tT: total testosterone; fT: free testosterone; Pca: prostate cancer.

*quantitative variables are expressed as median (range);

** PCa risk according to D'Amico classification

Table2. Demographic and clinical data according to PCa diagnosis

data	PCa	No PCa	p Value
Age*, years	69 (48-86)	68 (46-86)	< 0.001
PSA*, ng/mL	7.4 (1.6-1724)	6.9 (0.7-48.6)	< 0.001
DRE, positive (%)	602(17.9)	82 (2.4)	< 0.001
PV*, cm3	37.7 (10-136)	48.7 (7-159)	< 0.001
tT*, ng/dL	434(62-1167)	459.5 (107-1440)	< 0.001
fT*, pg/mL	4.8 (0.1-18)	5.5 (0.1-17.4)	< 0.001

DRE: digital rectal examination; PV: prostate volume; tT: total testosterone; fT: free testosterone; PCa: prostate cancer.

*quantitative variables are expressed as median (range)

Table3. Binary logistic regression analysis of the PCa risk with percentile distribution of total and free testosterone

variable	OR	95%CI	p Value
DRE	19.335	15.002-24.919	< 0.001
Age, years	1.036	1.024-1.049	< 0.001
PSA, ng/mL	1.027	1.015-1.039	< 0.001
fT1/4	0.792	0.709-0.883	< 0.001
tT1/4	0.857	0.769-0.956	< 0.005

DRE: digital rectal examination; tT1/4: total testosterone percentiles 0-10/10.1-50/50.1-90/90.1-100; fT1/4: free testosterone percentiles 0-10/10.1-50/50.1-90/90.1-100

OR: odds ratio. CI: confidence interval.

Table4. Binary logistic regression analysis of the PCa aggressiveness with percentile distribution of total and free testosterone

variable	High	Grade	High	Risk*
	OR (95%CI)	p value	OR (95%CI)	p value
DRE	1.085 (0.818-1.439)	p = 0.569	1.528 (1.129-2.066)	p < 0.006
Age, years	1.073 (1.050-1.096)	p < 0.001	1.090 (1.064-1.116)	p < 0.001
PSA, ng/mL	1.022 (1.016-1.029)	p < 0.001	1.181 (1.146-1.217)	p < 0.001
fT1/4	0.903 (0.756-1.080)	p = 0.263	1.184 (0.960-1.459)	p = 0.114
tT1/4	1.153 (0.966-1.376)	p = 0.115	1.058 (0.871-1.284)	p = 0.572

DRE: digital rectal examination; tT1/4: total testosterone percentiles 0-10/10.1-50/50.1-90/90.1-100; fT1/4: free testosterone percentiles 0-10/10.1-50/50.1-90/90.1-100

* Adaptation of D'Amico risk classification that includes local advanced disease

OR: odds ratio. CI: confidence interval.

6. CONCLUSION

In summary, in the present study we confirm the hypothesis that low testosterone levels increase the risk of prostate cancer. Moreover, our data suggest that fT is better correlated with PCa detection rather than tT. Although both parameters probably have a limited clinical application due to poor accuracy achieved in further analysis. We also failed to confirm that low testosterone levels increase tumor aggressiveness. The convenience of serum tT or fT assessment before the decision of PCa biopsy remains unclear.

REFERENCES

- [1] Heidenreich A., Bastian P. J., 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* 65(1), 124-137 (2014).
- [2] Huggins C., Clark P. J.: Quantitative studies of prostatic secretion: II. The effect of castration and of estrogen injection on the normal and the hyperplastic prostate glands of dogs. *J Exp Med* 72(6), 747-762 (1940).
- [3] Kaufman J. M., Vermeulen A.: The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocr Rev* 26(6), 833-876 (2005).
- [4] Isbarn H., Pinthus J. H., Marks L. S., Montorsi F., Morales A., Morgentaler A. et al.: Testosterone and prostate cancer: revisiting old paradigms. *Eur Urol* 56(1), 48-56 (2009).
- [5] Botelho F., Pina F., Figueiredo L., Cruz F., Lunet N.: Does baseline total testosterone improve the yielding of prostate cancer screening? *Eur J Cancer* 48(11), 1657-1663 (2012).
- [6] Nishiyama T., Hashimoto Y., Takahashi K.: The influence of androgen deprivation therapy on dihydrotestosterone levels in the prostatic tissue of patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10(21), 7121-7126 (2004).
- [7] Mendel C. M.: The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev* 10(3), 232-274 (1989).
- [8] Matsumoto A. M., Bremner W. J.: Serum testosterone assays--accuracy matters. *J Clin Endocrinol Metab* 89(2), 520-524 (2004).
- [9] Massengill J. C., Sun L., Moul J. W., Wu H., McLeod D. G., Amling C. et al.: Pretreatment total testosterone level predicts pathological stage in patients with localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol* 169(5), 1670-1675 (2003).
- [10] Teloken C., Da Ros C. T., Caraver F., Weber F. A., Cavalheiro A. P., Graziottin T. M.: Low serum testosterone levels are associated with positive surgical margins in radical retropubic prostatectomy: hypogonadism represents bad prognosis in prostate cancer. *J Urol* 174(6), 2178-2180 (2005).
- [11] Morgentaler A.: Testosterone and prostate cancer: an historical perspective on a modern myth. *Eur Urol* 50(5), 935-939 (2006).
- [12] Yano M., Imamoto T., Suzuki H., Fukasawa S., Kojima S., Komiya A. et al.: The clinical potential of pretreatment serum testosterone level to improve the efficiency of prostate cancer screening. *Eur Urol* 51(2), 375-380 (2007).
- [13] Muller R. L., Gerber L., Moreira D. M., Andriole G., Castro-Santamaria R., Freedland S. J.: Serum testosterone and dihydrotestosterone and prostate cancer risk in the placebo arm of the Reduction by Dutasteride of Prostate Cancer Events trial. *Eur Urol* 62(5), 757-764 (2012).
- [14] Mearini L., Zucchi A., Nunzi E., Villirillo T., Bini V., Porena M.: Low serum testosterone levels are predictive of prostate cancer. *World J Urol* 31(2), 247-252 (2013).
- [15] Garcia-Cruz E., Castaneda-Argaiz R., Carrion A., Alcover J., Sallent A., Leibar-Tamayo A. et al.: Preoperative hormonal pattern in patients undergoing radical prostatectomy due to prostate cancer. *Actas Urol Esp* 37(5), 280-285 (2013).
- [16] Daniels N. A., Nielson C. M., Hoffman A. R., Bauer D. C.: Sex hormones and the risk of incident prostate cancer. *Urology* 76(5), 1034-1040 (2010).
- [17] Rhoden E. L., Riedner C. E., Morgentaler A.: The ratio of serum testosterone-to-prostate specific antigen predicts prostate cancer in hypogonadal men. *J Urol* 179(5), 1741-1744 (2008).
- [18] Grosman H., Fabre B., Mesch V., Lopez M. A., Schreier L., Mazza O. et al.: Lipoproteins, sex hormones and inflammatory markers in association with prostate cancer. *Aging Male* 13(2), 87-92 (2010).
- [19] Schnoeller T., Jentzmik F., Rinnab L., Cronauer M. V., Damjanoski I., Zengerling F. et al.: Circulating free testosterone is an independent predictor of advanced disease in patients with clinically localized prostate cancer. *World J Urol* 31(2), 253-259 (2013).
- [20] Leon P., Seisen T., Cussenot O., Drouin S. J., Cattarino S., Comperat E. et al.: Low circulating free and bioavailable testosterone levels as predictors of high-grade tumors in patients

- undergoing radical prostatectomy for localized prostate cancer. *Urol Oncol* (2015).
- [21] Garcia-Cruz E., Huguet J., Piqueras M., Marquez M. P., Peri L., Izquierdo L. et al.: Low testosterone bioavailability is related to prostate cancer diagnose in patients submitted to prostate biopsy. *World J Urol* 30(3), 361-365 (2012).
- [22] Albisinni S., De Nunzio C., Tubaro A., Barry W. T., Banez L. L., Freedland S. J.: Greater percent-free testosterone is associated with high-grade prostate cancer in men undergoing prostate biopsy. *Urology* 80(1), 162-167 (2012).
- [23] Rosner W., Vesper H.: Toward excellence in testosterone testing: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* 95(10), 4542-4548 (2010).
- [24] Epstein J. I., Allsbrook W. C. J., Amin M. B., Egevad L. L.: The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 29(9), 1228-1242 (2005).
- [25] Roddam A. W., Allen N. E., Appleby P., Key T. J.: Endogenous sex hormones and prostate cancer: a collaborative analysis of 18 prospective studies. *J Natl Cancer Inst* 100(3), 170-183 (2008).
- [26] Morote J., Ramirez C., Gomez E., Planas J., Raventos C. X., de Torres I. M. et al.: The relationship between total and free serum testosterone and the risk of prostate cancer and tumour aggressiveness. *BJU Int* 104(4), 486-489 (2009).
- [27] Morote J., Planas J., Ramirez C., Gomez E., Raventos C. X., Placer J. et al.: Evaluation of the serum testosterone to prostate-specific antigen ratio as a predictor of prostate cancer risk. *BJU Int* 105(4), 481-484 (2010).
- [28] Regis L., Planas J., Celma A., de Torres I. M., Ferrer R., Morote J.: Behavior of total and free serum testosterone as a predictor for the risk of prostate cancer and its aggressiveness. *Actas Urol Esp* (2015).
- [29] Weiss J. M., Huang W. Y., Rinaldi S., Fears T. R., Chatterjee N., Hsing A. W. et al.: Endogenous sex hormones and the risk of prostate cancer: a prospective study. *Int J Cancer* 122(10), 2345-2350 (2008).
- [30] Gill J. K., Wilkens L. R., Pollak M. N., Stanczyk F. Z., Kolonel L. N.: Androgens, growth factors, and risk of prostate cancer: the Multiethnic Cohort. *Prostate* 70(8), 906-915 (2010).
- [31] Koo J. M., Shim B. S.: Significance of Serum Testosterone for Prostate-Specific Antigen (PSA) Elevation and Prediction of Prostate Cancer in Patients with PSA Above 10 ng/ml. *Korean J Urol* 51(12), 831-835 (2010).
- [32] Hyde Z., Flicker L., McCaul K. A., Almeida O. P., Hankey G. J., Chubb S. A. et al.: Associations between testosterone levels and incident prostate, lung, and colorectal cancer. A population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21(8), 1319-1329 (2012).
- [33] Kaaks R., Lukanova A., Rinaldi S., Biessy C., Soderberg S., Olsson T. et al.: Interrelationships between plasma testosterone, SHBG, IGF-I, insulin and leptin in prostate cancer cases and controls. *Eur J Cancer Prev* 12(4), 309-315 (2003).
- [34] Wiren S., Stocks T., Rinaldi S., Hallmans G., Bergh A., Stenman U. H. et al.: Androgens and prostate cancer risk: a prospective study. *Prostate* 67(11), 1230-1237 (2007).
- [35] Sawada N., Iwasaki M., Inoue M., Sasazuki S., Yamaji T., Shimazu T. et al.: Plasma testosterone and sex hormone-binding globulin concentrations and the risk of prostate cancer among Japanese men: a nested case-control study. *Cancer Sci* 101(12), 2652-2657 (2010).
- [36] Shea J. L., Wongt P. Y., Chen Y.: Free testosterone: clinical utility and important analytical aspects of measurement. *Adv Clin Chem* 63, 59-84 (2014).
- [37] Rivera P., Tagle R., Mir S., Gonzalez R.: [Relationship between serum testosterone levels and prostatic cancer]. *Actas Urol Esp* 27(10), 788-792 (2003).
- [38] Altman D. G., Bland J. M.: Diagnostic tests 3: receiver operating characteristic plots. *BMJ* 309(6948), 188 (1994).
- [39] Morgentaler A.: Testosterone deficiency and prostate cancer: emerging recognition of an important and troubling relationship. *Eur Urol* 52(3), 623-625 (2007).
- [40] Salonia A., Gallina A., Briganti A., Abdollah F., Suardi N., Capitanio U. et al.: Preoperative

hypogonadism is not an independent predictor of high-risk disease in patients undergoing radical prostatectomy. *Cancer* 117(17), 3953-3962 (2011).

- [41] Salonia A., Abdollah F., Capitanio U., Suardi N., Briganti A., Gallina A. et al.: Serum sex steroids depict a nonlinear u-shaped association with high-risk prostate cancer at radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 18(13), 3648-3657 (2012).
- [42] Hoffman M. A., DeWolf W. C., Morgentaler A.: Is low serum free testosterone a marker for high grade prostate cancer? *J Urol* 163(3), 824-827 (2000).
- [43] Zhang P. L., Rosen S., Veeramachaneni R., Kao J., DeWolf W. C., Bubley G.: Association between prostate cancer and serum testosterone levels. *Prostate* 53(3), 179-182 (2002).
- [44] Platz E. A., Leitzmann M. F., Rifai N., Kantoff P. W., Chen Y. C., Stampfer M. J. et al.: Sex steroid hormones and the androgen receptor gene CAG repeat and subsequent risk of prostate cancer in the prostate-specific antigen era. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(5), 1262-1269 (2005).
- [45] Xylinas E., Ploussard G., Durand X., Fabre A., Salomon L., Allory Y. et al.: Low pretreatment total testosterone (< 3 ng/mL) predicts extraprostatic disease in prostatectomy specimens from patients with preoperative localized prostate cancer. *BJU Int* 107(9), 1400-1403 (2011).
- [46] Yamamoto S., Yonese J., Kawakami S., Ohkubo Y., Tatokoro M., Komai Y. et al.: Preoperative serum testosterone level as an independent predictor of treatment failure following radical prostatectomy. *Eur Urol* 52(3), 696-701 (2007).
- [47] McShane L. M., Midthune D. N., Dorgan J. F., Freedman L. S., Carroll R. J.: Covariate measurement error adjustment for matched case-control studies. *Biometrics* 57(1), 62-73 (2001).

AUTHOR'S BIOGRAPHY



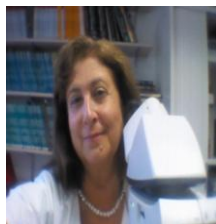
Dr. Lucas Regis, specializes in adult urology with expertise in urologic cancer and minimally invasive surgery. He is an European Urological Association member who works in the Vall d' Hebron Hospital in Barcelona Spain. He is currently developing a PhD program in surgery at the Universitat Autònoma de Barcelona – UAB. He has published several articles in peer reviewed journals and he has presented research at the national AUA meeting as well as the EAU annual meetings.



Doctor A. Celma, specializes in adult urology with expertise in prostate cancer, screening, epidemiology and biomarkers and minimally invasive surgery. She trained in Urology at Vall d'Hebron Hospital and he obtained the PhD with magna cum laude at the Universitat Autònoma de Barcelona – UAB. She also has published several articles in peer reviewed journals and he has presented research at the national AUA meeting as well as the EAU annual meeting.



Doctor J. Planas, specializes in adult urology with expertise in prostate cancer, advanced and metastatic disease and minimally invasive surgery. He trained in Urology at Bellvitge Hospital and he obtained the PhD with magna cum laude at the Universitat Autònoma de Barcelona – UAB. He was the winner of the Spanish Association of Urology Best PhD thesis of the year. He also has published several articles in peer reviewed journals and he has presented research at the national AUA meeting as well as the EAU annual meeting.



Ines de Torres, is GU Consultant Pathologist in the Pathology Department Vall d'Hebron University Hospital as well as Titular Professor in the Morphological Sciences Department at the Autonomous University of Barcelona . She has a extensive experience in diagnosis and uropathologic research. In this line she has collaborated on translational research with biomedical groups in basic research with excellent results and relevant international publications. Moreover, she coordinates the Tumor Bank Hospital Vall d'Hebron and she is member of the

Ethics Committee of Clinical Research at the Hospital Vall d'Hebron .Currently as member of the European Network of Uropathology actively collaborates with several multicenter clinical studies and as referent uropathologist regularly participates at forums and conferences in this area .She has authored book chapters on predictive biomarkers in bladder and prostate cancer .

Determined Free Serum Testosterone is Better than Total Testosterone as a Predictor of Prostate Cancer Risk



R. Ferrer, is graduated in Pharmacy at the University of Barcelona. She is a Clinical Biochemistry Specialist at the Endocrinology Section of the Biochemistry Department in Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona. Currently finishing the Doctoral program in Biomedicine at the University of Barcelona with the research line: Metabolism, metabolic signalling and related pathologies. Member of the SEQC (Spanish Association of Clinical Chemistry and Molecular Pathology) with participation in the Committee of Communication and the Hormone Working Group. R. Ferrer is also a editorial board member of the Revista del Laboratorio Clínico, sponsored by the Spanish Association of Medical Biopathology (AEBM), Spanish Association of Analyst Pharmacists (AEFA) and Spanish Society of Clinical Biochemical and Molecular Pathology (SEQC) and she is member of the Board of directors of the ACCLC (Catalan Association of Clinical Laboratory Sciences).



Doctor Juan Morote, is Professor and Chairman of Urology at Vall d'Hebron Hospital and Autònoma University of Barcelona. He trained in Urology at Vall d'Hebron Hospital and completed its training in Harvard Medical School and London University. He obtained the PhD in 1986 with magna cum laude with the thesis: "Prostate Specific Antigen in Human Clinic" and the Fellow in the European Board of Urology in 1992. His area of interest is prostate cancer. He has dedicated it effort to improve outcomes of radical prostatectomy procedure, hormone therapy, and basic and clinical research on new markers for early diagnosis and prognosis, secondary effects of androgen suppression and diagnosis of castrate resistance. In 1994 he founded the Vall d'Hebron Prostate Cancer Translational Research Program. He has co-authored 282 articles in peer review journals and 4 patents. He has served in different positions of urologic societies and journals editorial comities. From 2006 to 2014 he was the chairman of the Urology Board at the Spanish Ministry of Health.



Actas Urológicas Españolas

www.elsevier.es/actasuro



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Determinación de la testosterona sérica durante la supresión androgénica en pacientes con cáncer de próstata: una revisión sistemática

J. Morote, L. Regis*, A. Celma y J. Planas

Servicio de Urología, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

Recibido el 25 de diciembre de 2015; aceptado el 15 de enero de 2016

PALABRAS CLAVE

Cáncer de próstata;
Supresión androgénica;
Testosterona

Resumen

Introducción: Las guías de práctica clínica recomiendan determinar testosterona sérica (TS) durante la supresión androgénica (SA) para evaluar su eficacia y definir la resistencia a la castración (RC). Los objetivos de esta revisión sistemática han sido evaluar la evidencia científica que puede justificar su control durante la SA, cuándo hacerlo y para qué.

Material y métodos: Se realizó un búsqueda en PubMed con los términos MeSH: *androgen suppression, testosterone, and prostate cancer*. Se acotó la búsqueda a artículos originales publicados en inglés.

Resultados: Se encontraron 8 publicaciones que analizaron el impacto clínico de la concentración de TS durante la SA. En todas las series se determinó la TS mediante ensayos quimioluminiscentes. Sin embargo, solamente métodos indirectos basados en cromatografía líquida o gaseosa para su extracción y posterior cuantificación mediante espectrometría de masas son recomendados, especialmente para determinar niveles bajos. Los objetivos fueron supervivencia específica y libre de RC. Seis estudios fueron retrospectivos. Las series no fueron uniformes respecto al estadio clínico, tipos de SA y forma de valorar la TS. En general, niveles de bajos de TS (< 20 ng/dl o < 32 ng/dl) se relacionaron con mayor supervivencia libre de RC. Las determinaciones se realizaron cada 3 o 6 meses. En 4 estudios se confirmó el efecto beneficioso de añadir bicalutamida cuando se detectaron microelevaciones por encima de 50 ng/dl.

Conclusiones: El nivel de evidencia científica que justifica la determinación de TS durante la SA es bajo, y los métodos utilizados para su cuantificación inapropiados. A pesar de ello, se considera útil controlar los niveles de TS durante la SA, y parece existir una asociación entre niveles bajos y mejor evolución de la enfermedad. En caso de microelevaciones por encima de 50 ng/dl se recomienda la administración de bicalutamida.

© 2016 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lucasregis@gmail.com (L. Regis).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2016.01.006>

0210-4806/© 2016 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Prostate cancer;
Androgenic
suppression;
Testosterone

Measurement of serum testosterone during androgenic suppression in patients with prostate cancer: A systematic review

Abstract

Introduction: Clinical practice guidelines recommend measuring serum testosterone (ST) during androgenic suppression (AS) to assess its efficacy and define castration resistance (CR). The objectives of this systematic review were to assess the level of scientific evidence that justify checking ST levels during AS, when to perform it and for what purpose.

Material and methods: We performed a search in PubMed with the following mesh terms: androgen suppression, testosterone, and prostate cancer. The search was narrowed to original articles published in English.

Results: We found 8 publications that analysed the clinical impact of ST concentrations during AS. In all of the series, ST was measured using chemiluminescent assays. However, only indirect methods based on liquid or gas chromatography for its extraction and subsequent quantification using mass spectrometry are recommended, especially for measuring low levels. The endpoints were specific survival and CR-free survival. Six studies were retrospective. The series were not uniform in terms of clinical stage, types of AS and ST assessment methods. In general, low ST levels (<20 ng/dL or <32 ng/dL) were related to longer CR-free survival. The measurements were performed every 3 or 6 months. Four studies confirmed the beneficial effect of adding bicalutamide when detecting microelevations above 50 ng/dL.

Conclusions: The level of scientific evidence justifying the measurement of ST during AS is low, and the methods employed for quantifying ST levels are inadequate. However, we consider it useful to check ST levels during AS, and there appears to be an association between low ST levels and better disease outcomes. In the event of microelevations above 50 ng/dL, we recommend the administration of bicalutamide.

© 2016 AEU. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La hormonodependencia del cáncer de próstata (CP) fue demostrada por Huggins hace más de 70 años¹. La supresión androgénica (SA) es la modalidad de hormonoterapia más frecuentemente utilizada, y se recomienda en pacientes con CP avanzado y de forma neoadyuvante a la radioterapia². El objetivo de la SA es la depleción sistémica de testosterona, y se consigue mediante la castración quirúrgica o médica, a través de la administración de análogos o antagonistas de la LHRH. No obstante, esa depleción de testosterona no es completa, ya que además de la síntesis testicular, el córtex suprarrenal aporta entre el 5% y el 10% de la testosterona sérica (TS), y en determinadas circunstancias el mismo tejido prostático puede sintetizar andrógenos, aunque su contribución a la concentración de TS es probablemente imperceptible³.

De manera arbitraria, en 1984 se fijó en 50 ng/dl el nivel de castración de TS, al ser ese el mínimo nivel detectable que los ensayos disponibles en esa época permitían⁴. Ese nivel todavía es utilizado por las agencias del medicamento para evaluar la eficacia de los análogos y antagonistas de la LHRH, y sigue siendo un criterio para definir la resistencia a la castración (RC). En el año 2000 Oefelein et al.⁵, utilizando un ensayo quimioluminiscente, redefinieron el nivel de TS castración en 20 ng/dl en un grupo de 35 pacientes con CP sometidos a orquiectomía. El nivel de TS osciló entre 2 y 30 ng/dl, siendo el valor mediano 15 ng/dl, y 20 ng/dl el que representó el 75 percentil. En 2007 Morote et al.⁶ situaron

en 32 ng/dl el menor nivel de TS con impacto clínico en la supervivencia libre de RC, y también confirmaron el efecto beneficioso del tratamiento con bicalutamida en pacientes que experimentan microelevaciones de TS por encima de 50 ng/dl, maniobra recomendada hasta entonces con nivel D en las guías NCCN⁷.

La TS se determina en la práctica clínica habitual mediante ensayos quimioluminiscentes. Estos ensayos actualmente permiten detectar niveles de hasta 2,5 ng/dl, se utilizan en plataformas automatizadas, son baratos y precisan bajo volumen de suero. Sin embargo, sus coeficientes de variación, especialmente cuando cuantifican niveles bajos de testosterona, son inaceptablemente amplios y su reproducibilidad baja. Por ello, la Sociedad Americana de Endocrinología recomienda determinar la TS mediante ensayos indirectos que utilizan cromatografía líquida o gaseosa para extraer la testosterona en una primera fase, y así evitar la contaminación del medio con otras proteínas, especialmente esteroides. En una segunda fase se realiza su cuantificación mediante espectrometría de masas. Estos métodos (LC/GC MSMS) permiten detectar niveles de hasta 0,5 ng/dl, tienen coeficientes de variación bajos, son muy reproducibles y están estandarizados. Por el contrario, no son automatizados, requieren tiempo y personal especializado, grandes volúmenes de suero y, además, son caros^{8,9}. Nuestro objetivo ha sido evaluar la evidencia científica que permitiría responder a las siguientes preguntas: 1) ¿Es recomendable determinar la TS durante la SA?; 2) ¿Cuándo?; y 3) ¿Para qué?

Adquisición de la evidencia científica

Hemos realizado una búsqueda en PubMed entre 1980 y 2015 que incluyó palabras del *Medical Subject Headings: androgen suppression, testosterone, and prostate cancer*. Se encontraron 6.391 artículos de los cuales se seleccionaron 474 realizados en humanos, adultos y publicados en inglés. De ellos se seleccionaron 57 artículos que analizaban la determinación de testosterona durante la evolución de pacientes sometidos a SA. Finalmente, se analizan 8 artículos originales que estudian el impacto clínico de la concentración de TS durante la SA^{6,10-16} (fig. 1).

Síntesis de la evidencia científica

Revisamos cada uno de los 8 estudios seleccionados por orden cronológico de publicación. La [tabla 1](#) resume las características y resultados de cada uno de ellos.

Estudio 1. Morote et al., 2007⁶. Se trata de un estudio retrospectivo que evaluó las microelevaciones de TS, determinadas mediante un ensayo quimioluminiscente (Inmulite, DPC Inc.) en 73 pacientes con CP no diseminado tratados con diversos análogos de LHRH. Se analizaron las determinaciones de TS realizadas a los 6, 12 y 18 meses desde el inicio de la SA. El objetivo primario fue evaluar supervivencia libre de RC. Los autores encontraron en 32 ng/dl el mínimo nivel de TS que permitió definir que los pacientes con microelevaciones tuvieron menor supervivencia libre de RC. El número de eventos durante un seguimiento medio de 51 meses fue del 62%. También se observó que los pacientes con microelevaciones por encima de 50 ng/dl se beneficiaron del bloqueo androgénico máximo con bicalutamida, y tuvieron una supervivencia libre de RC similar a la de los pacientes sin microelevaciones.

Estudio 2. Perachino et al., 2009¹⁰. Este fue un estudio retrospectivo en el que se analizaron las determinaciones

trimestrales de TS durante el seguimiento de 129 pacientes con CP diseminado que recibieron goserelina. Las determinaciones de TS se realizaron mediante un ensayo quimioluminiscente (Inmulite, DPC Inc.). El objetivo del estudio fue evaluar supervivencia específica. El seguimiento medio fue de 47 meses y se detectaron 71 eventos (55%). Los autores únicamente realizaron un análisis de regresión de logística que puso de manifiesto que la suma de Gleason, el nivel de PSA y de TS, al sexto mes de tratamiento, fueron predictores independientes de supervivencia específica.

Estudio 3. Pickles et al., 2012¹¹. Este estudio analizó retrospectivamente 11.752 pacientes con CP sometidos a radioterapia entre 1998 y 2007 en la Columbia británica de Canadá. Finalmente, seleccionaron 2.196 pacientes que habían recibido tratamiento con análogos de la LHRH en forma neoadyuvante durante un periodo inferior a 12 meses, que la duración global de la SA había sido superior a 3 meses, y que tenían alguna determinación de TS durante la SA. El método para cuantificar TS fue un radioinmunoanálisis manual hasta 2004, y posteriormente un ensayo quimioluminiscente automatizado (Elecsys, Roche Inc.). Se analizaron 4.954 determinaciones, 2 como media por paciente¹⁻¹⁷. El objetivo de este estudio fue relacionar microelevaciones de TS y recidiva bioquímica según la definición de Phenix (PSA nadir + 2). Durante un seguimiento medio de 45 meses la tasa de pacientes sin progresión fue del 73% en el grupo de pacientes sin microelevaciones, del 68,4% en el grupo con microelevaciones por encima de 1,1 nmol/l y del 57,6% cuando fueron superiores a 1,7 nmol/l, $p < 0,001$.

Estudio 4. Dason et al., 2013¹². En este estudio se determinó prospectivamente TS trimestral mediante quimioluminiscencia automatizada (Advia-Centaur, Siemens Inc.) a 32 pacientes con CP tratados con análogos o antagonistas de la LHRH. El objetivo fue determinar el impacto de los niveles de TS en supervivencia libre de RC. Una característica

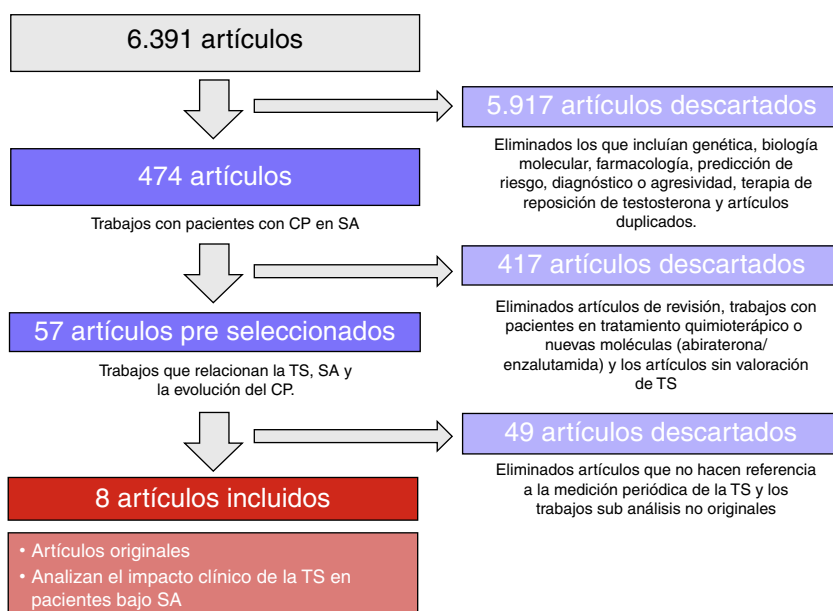


Figura 1 Búsqueda en PubMed: *androgen suppression, testosterone and prostate cancer*.

Tabla 1 Características de los estudios que han analizado la influencia de los niveles de TS en la evolución de los pacientes con CP sometidos a SA

Autor	N.º de pts	Estadio clínico	Tratamiento	Tiempo de las determinaciones	Ensayo	Objetivos	Resultados y observaciones
Morote et al., 2007 ⁶	73	LA 50; PB 23	LHRH agonista 45 y BAM 28	6, 12, y 18 meses	Inmulite, DPC	SLRC	32 ng/dl mínimo nivel de TS con impacto en SLRC. Si microelevaciones por encima de 50 ng/dl, mejor SLRC si reciben bicalutamida
Perachino et al., 2009 ¹⁰	129	M 129	LHRH agonista	Cada 3 meses	Inmulite, DPC	S	Menores niveles de TS a los 6 meses de SA mayor S en análisis multivariante
Pickles et al., 2012 ¹¹	2196	L o LA	RDT y LHRH agonista	Seriado, media 2 (1-17)	Elecsys, Roche	SLRC	Microelevaciones entre 1.1 y 1.7 nmol/l predicen 58% SLRC a 5 años vs 78% si no microelevaciones
Dason et al., 2013 ¹²	32	M 14; LA 5; PB 13	LHRH agonista o antagonistas	Cada 3 meses	Centaur, Siemens	SLRC	Pts con microelevaciones > 50 ng/ml excluidos. TS a los 9 meses < 32 ng/dl mejor SLRC. TS media durante el primer año de SA < 32 ng/dl mejor SLRC
Bertaglia et al., 2013 ¹³	153	M 51; PB 99	LHRH agonista	A los 6 meses	Architect, Abbot	SLRC y S	Diferencias solo en pts M. TS a 6 meses < 20 ng/dl mejor S. TS a 6 meses < 20 vs 20-50 vs > 50 ng/dl se relaciona con la SLRC
Yosuda et al., 2015 ¹⁴	69	M 69	BAM	Cada 3-6 meses	Elecsys, Roche	SLRC y S	TS media durante el BAM sin relación con SLRC o S
Klotz et al., 2015 ¹⁵	626	PB	LHRH agonista	Cada 3 meses (primer año)	NA	SLRC y S	Nadir TS < 0,7 nmol/l mayor SLRC y S. Microelevaciones > 1,7 nmol/l menor SLRC o S
Kamada et al., 2015 ¹⁶	225	L 70; LA 51; M 104	BAM	Cada 3 meses	Architect, Abbot	SLRC y S	Nadir TS durante el seguimiento < 20 ng/dl y 6 meses TS < 20 ng/dl mayor S pero no relación con SLRC. Solo 12% de mortalidad

BAM: bloqueo androgénico máximo; L: localizado; LA: localmente avanzado; M: metastásico; NE: no especificado; PB: progresión bioquímica después de radioterapia o prostatectomía radical; RDT: radioterapia; S: supervivencia; SLRC: supervivencia libre de resistencia a castración.

especial de este estudio fue que se excluyeron 7 de los 39 pacientes inicialmente incluidos (17,9%) por tener una TS superior a 50 ng/dl. Se evaluaron 20 ng/dl y 32 ng/dl como niveles de corte a 6 y 9 meses de tratamiento, así como el nivel medio de las determinaciones realizadas durante el primer año de SA. Se incluyeron 14 pacientes con enfermedad diseminada, 5 con CP localmente avanzado y 13 con recidiva bioquímica después de tratamiento local. El seguimiento medio fue de 26 meses, y se detectaron eventos en la mitad de los pacientes. Un nivel medio de TS inferior a 32 ng/dl se asoció a mayor supervivencia libre de RC. Esta asociación también se observó al evaluar la TS a los 9 meses de SA, pero no correspondiente a los 6 meses. Niveles de corte inferiores a 20 ng/dl durante el primer año de SA no se relacionaron con la supervivencia libre de RC. Destacar que la RC fue considerada únicamente cuando existieron 2 incrementos de PSA por encima del nadir.

Estudio 5. Bertaglia et al., 2013¹³. Este estudio incluyó de forma prospectiva 153 pacientes con CP tratados con análogos de la LHRH entre 2002 y 2006. Se determinó TS mediante un ensayo quimioluminiscente (Architect, Abbot Inc.) a los 6 y 7 meses de seguimiento, y se seleccionó la determinación inferior para el estudio. En 53 pacientes el CP estaba diseminado o localmente avanzado y en 99 existía progresión bioquímica después de un tratamiento local. El seguimiento medio fue de 65 meses y en este periodo se detectaron 72 progresiones (47%), definidas como un incremento de PSA superior al 50% del nadir o aparición de nuevas lesiones y 51 exitus (33%). Los autores remarcan que en 59 de los 69 pacientes que experimentaron microelevaciones de TS por encima de 50 ng/dl añadieron bicalutamida 50 mg/d al tratamiento con análogos de la LHRH. El análisis multivariante reveló que los niveles de TS no se asociaron a la supervivencia libre de RC ni a supervivencia específica. Sin embargo, al recodificar la TS por debajo de 20, 30 y 50 ng/dl encontraron que los pacientes con TS por debajo de 30 ng/dl y 50 ng/dl se asociaron a mayor supervivencia específica, pero no progresión. El análisis actuarial según los niveles de 20, 30 y 50 ng/dl no reveló diferencias en pacientes con recidiva bioquímica, y sí en pacientes con enfermedad diseminada o localmente avanzada. Los autores encontraron igual evolución en los pacientes con microelevaciones de TS por encima de 50 ng/dl que recibieron bicalutamida.

Estudio 6. Yasuda et al., 2015¹⁴. Este estudio analizó retrospectivamente una serie de 69 pacientes con CP sometidos a bloqueo androgénico máximo, con análogos de LHRH y bicalutamida 80 mg/d, entre 2004 y 2010. Se determinó TS mediante un ensayo quimioluminiscente (Elecsys, Roche Inc.), cada 3 o 6 meses durante el seguimiento hasta la progresión bioquímica. El número medio de determinaciones fue 5,5 (1-21). Durante un seguimiento medio de 40 meses 62 pacientes progresaron (90%) y 20 (30%) fallecieron por causa específica. No se encontró una asociación significativa entre cualquiera de los niveles de TS y la supervivencia libre de progresión ni la supervivencia específica.

Estudio 7. Klotz et al., 2015¹⁵. En este estudio se analizaron retrospectivamente los niveles de TS, determinados durante el primer año de seguimiento, a 626 pacientes con CP no diseminado sometidos SA continua con análogos de la LHRH. Se trata de un subanálisis del grupo control del estudio PR-7, que comparó SA intermitente frente a continua en pacientes con recidiva bioquímica después de

prostatectomía radical más/menos radioterapia adyuvante o de rescate. El estudio se inició en Canadá en 1998, y posteriormente también se realizó en EE. UU. y Reino Unido. Los pacientes incluidos podían haber recibido radioterapia adyuvante o de rescate antes de 12 meses de su inclusión, debían tener un PSA superior a 3 ng/ml, no evidencia de diseminación metastásica, un nivel de TS superior a 5 nmol/l (144 ng/dl) y al menos 3 determinaciones de TS durante el primer año de seguimiento. No se especificó el método para determinar la TS. El objetivo de este subanálisis fue evaluar la asociación entre los niveles de TS, supervivencia global y libre de RC. La RC se definió cuando se detectaron 3 incrementos consecutivos de PSA separados por un intervalo superior a un mes, llegando a ser superior a 4 ng/ml, y un nivel de TS inferior a 3 nmol/l (87 ng/dl). Los niveles mínimo, medio y máximo de TS se distribuyeron en 3 categorías: inferior a 0,7 nmol/l, entre 0,7 y 1,7 nmol/l y superior a 1,7 nmol/l. Se detectaron 226 eventos de RC (37%). El tiempo medio hasta la RC fue de 10 años y la tasa de supervivencia libre de RC a 5 años del 69%. La supervivencia libre de RC en pacientes con nadir de TS inferior a 0,7 nmol/l fue 10 años, 7,2 en pacientes con nadir de testosterona entre 0,7 y 1,7 nmol/l, y 3,6 cuando fue superior a 1,7 nmol/l, $p < 0,001$. También se detectaron diferencias significativas en relación con la supervivencia específica. En el caso de los niveles medios de TS se encontraron diferencias significativas respecto a la supervivencia libre de RC, pero no de supervivencia específica. Finalmente, cuando el nivel máximo de TS fue inferior a 0,7 nmol/l no se alcanzó la mediana de supervivencia libre de RC. En pacientes que tuvieron un máximo de TS entre 0,7 y 1,7 nmol/l fue 8,9 años y cuando fue superior a 1,7 nmol/l, 10 años, $p < 0,001$. También se constataron diferencias significativas en supervivencia específica. La supervivencia mediana libre de RC de los pacientes cuya media de TS fue superior a 1,7 nmol/l fue 4,2 años, frente a 6,4 años en el grupo entre 1,7 y 0,7 nmol/l, y no alcanzó el 50% en el subgrupo de pacientes cuya TS media fue inferior a 0,7 nmol/l, $p < 0,01$. En el caso de los valores nadir TS, solo existieron diferencias significativas entre el grupo de pacientes con nivel $< 0,7$ nmol/l y por encima de 1,7 nmol/l. Finalmente, al analizar los valores máximos de TS, no se evidenciaron diferencias significativas. Ningún análisis mostró diferencias significativas respecto a la supervivencia específica.

Estudio 8. Kamada et al., 2015¹⁶. Fue un estudio retrospectivo que incluyó 225 pacientes con CP tratados entre 1999 y 2015, con bloqueo androgénico máximo mediante castración con análogos de LHRH (94%), orquiectomía (3,6%) y degarelix (3,1%), además de bicalutamida (93%) o flutamida (7%). En 104 pacientes la enfermedad estaba diseminada, en 51 localmente avanzada y en 70 existía recidiva bioquímica después de tratamiento local. Se determinó la TS trimestralmente mediante un ensayo quimioluminiscente (Architect, Abbot Inc.). Durante un periodo de seguimiento no especificado se registraron 28 exitus (12%), y aunque tampoco se especificaban los episodios de RC, se describe que 52 pacientes (23%) recibieron docetaxel. No se encontró asociación entre los niveles de TS al sexto mes de tratamiento, ni entre el nadir de TS y la supervivencia libre de RC. Por el contrario, sí se observó mayor supervivencia global en el grupo de pacientes con nadir de TS inferior a 20 ng/dl.

Discusión

En el año 2007 se publicó el primer estudio que analizó si existía un nivel de TS durante la SA con impacto clínico en la supervivencia libre de RC⁶. Este estudio proporcionó un nivel de evidencia tipo III, y solamente incluyó pacientes con enfermedad no diseminada. Se estableció en 32 ng/dl en menor nivel TS con impacto clínico, y además se observó un efecto beneficioso al administrar bicalutamida en pacientes con microelevaciones de TS por encima de 50 ng/dl. Este estudio también puso de manifiesto que pequeñas microelevaciones de TS entre 20 ng/dl y 32 ng/dl no tenían impacto clínico, y por ello desacreditaba el mito relacionado con el nivel de TS durante la SA: *the lowest the best*¹⁷. En 2009 Perachino et al.¹⁰ analizaron también retrospectivamente el nivel de TS determinado al noveno mes de SA en una serie de 129 pacientes con CP diseminado. En un análisis multivariante los autores observaron que a menor concentración de TS existía mayor supervivencia específica. Lamentablemente esta serie no analizó si existía algún nivel de TS con impacto en la supervivencia, de manera que de nuevo se acreditaba el mito *the lowest the best*¹⁷. Cronológicamente consecutivo a los 2 estudios anteriores, en 2012 Pickles et al.¹¹ publicaron el único estudio que ha analizado el impacto de las microelevaciones de TS en la progresión bioquímica de pacientes sometidos a radio-hormonoterapia. Los autores concluyeron que la probabilidad de progresión a 5 años fue significativamente superior cuando existieron microelevaciones por encima de 0,7 nmol/l (20 ng/dl), y todavía era mayor si eran superiores a 1,7 nmol/l (50 ng/dl), respecto a los pacientes que siempre tuvieron la TS por debajo de 0,7 nmol/l. Este fue un trabajo retrospectivo que incorporó más de 4.000 pacientes. No obstante, no había constancia respecto a las dosis de radioterapia administradas ni tampoco del tiempo de SA. Los autores concluyeron que niveles de TS inferiores a 20 ng/dl se asociaron a mejor evolución de la enfermedad. En 2013 Dason et al.¹² fortalecieron, con un nivel de evidencia tipo II, el nivel de 32 ng/dl de TS como punto de corte con impacto clínico, y cuestionaron si alcanzar niveles por debajo de 20 ng/dl era relevante clínicamente. También en 2013 Bertaglia et al.¹³ pusieron de manifiesto, con un nivel de evidencia tipo II, que la concentración de TS tenía valor pronóstico en pacientes con enfermedad localmente avanzada o diseminada, pero no en pacientes con recidiva bioquímica después de tratamiento local. Los autores observaron que un nivel de TS inferior a 20 ng/dl no tuvo valor pronóstico, pero sí un nivel inferior a 30 ng/dl. Este dato refuerza nuevamente los hallazgos de Morote⁶ y Dason¹², que previamente habían reportado el nivel de 32 ng/dl como dintel de castración con impacto clínico. En este estudio también se confirmó el beneficio de añadir bicalutamida en pacientes con microelevaciones de TS por encima de 50 ng/dl con un nivel de recomendación B, ya que estos pacientes tuvieron una evolución similar a la de los pacientes sin este tipo de microelevaciones. En 2015 se han publicado 3 artículos. Yasuda et al.¹⁴ estudiaron retrospectivamente una serie de 69 pacientes con enfermedad diseminada y tratados con bloqueo androgénico máximo, sin encontrar diferencias significativas en la evolución de la enfermedad en relación con el nivel de TS. Los autores concluyeron que ese hecho

podría ser debido al papel de la bicalutamida, evitando que pequeñas microelevaciones de TS, de origen preferentemente adrenal, incrementaran los niveles intracelulares de dihidrotestosterona. Este estudio, publicado en formato breve, solamente analizó el nivel medio de TS durante el primer año de seguimiento. Podemos, por tanto, interpretar que este estudio soporta indirectamente el beneficio de bicalutamida cuando existen microescapes de TS^{6,12}. Klotz et al.¹⁵ analizaron los niveles de TS en una amplia serie prospectiva de 626 pacientes, que formó el brazo control de tratamiento con SA continua del estudio PR-7. Los autores concluyeron que un nadir de TS inferior a 0,7 nmol/l (20 ng/dl) durante el primer año de SA se asoció a mayor supervivencia específica y mayor supervivencia libre de RC. Curiosamente, este es el único estudio que no especificó el método utilizado para la determinación de TS. Finalmente, el estudio de Kamada et al.¹⁶ también puso de manifiesto que la administración sistemática de bicalutamida parecía minimizar el efecto negativo de las microelevaciones de TS en relación con la supervivencia libre de RC. Secundariamente, los autores sugerían que niveles de TS inferiores a 20 ng/dl podían incrementar la supervivencia específica, si embargo la tasa de eventos fue tan solo de 12%.

La evidencia científica, basada en el análisis de estos 8 estudios, sugiere que no existe un consenso global sobre cuál es el dintel de TS con impacto clínico y tampoco sobre la conveniencia de controlar los niveles de TS durante la SA. Sin embargo, sí podemos concluir que la mayoría de estudios lo sitúan por debajo de 50 ng/dl, y que existirían discrepancias entre 20 ng/dl^{11,15,16} y alrededor de 30 ng/dl^{6,12,13}. Debe destacarse la heterogeneidad de las series respecto al estadio clínico, 2 series incluyeron solo pacientes con enfermedad diseminada^{10,14}, 3 con enfermedad localizada^{6,11,15} y otras 3 con ambas^{12,13,16}. Respecto al tipo de SA utilizada también fue diversa, bloqueo androgénico máximo en 2 series^{14,16} y castración médica con análogos de LHRH o antagonistas en 5^{10-13,15}. En una serie se utilizó indistintamente ambas modalidades de SA⁶, y en otra se añadió bicalutamida cuando se detectaron microelevaciones por encima de 50 ng/dl¹³. No hemos encontrado ninguna evidencia que justifique una determinada carencia en la determinación de TS. Sin embargo, en la mayoría de los estudios se determinó cada 3 o 6 meses, quizás haciéndolo coincidir con las determinaciones de PSA. Solamente un estudio en la literatura ha analizado si es posible predecir microescapes de TS durante la SA. Este estudio concluyó que 3 determinaciones consecutivas de TS por debajo de 20 ng/dl fue predictor de ausencia de microelevaciones futuras por encima de 50 ng/dl¹⁸. De cualquier manera, si se utiliza un método para determinar TS sencillo y barato lo recomendable sería determinarla en cada control de PSA. Finalmente, todos los estudios que lo han analizado sugieren el beneficio de administrar bicalutamida en pacientes con microelevaciones de TS por encima de 50 ng/dl^{6,13,14,16}. Nuestro grupo ha publicado recientemente una revisión sistemática sobre el papel de la TS y su fracción libre en el diagnóstico del CP y de su agresividad. Igual que en la presente revisión, la variabilidad en el diseño de los estudios, en los métodos de cuantificación y la heterogeneidad de los pacientes incluidos no permitieron establecer una relación fiable entre estas hormonas y el CP¹⁹.

Nos parece obligado reflexionar sobre el método para cuantificar TS en pacientes sometidos a SA^{7,8}. Los únicos métodos estandarizados son los indirectos, es decir, los que previamente a su cuantificación extraen la testosterona mediante cromatografía líquida o gaseosa para evitar la contaminación del medio con otras proteínas, especialmente esteroides. Una vez realizado este proceso, que evita la sobreestimación de testosterona, la espectrometría de masas es el método más exacto y reproducible, ya que los coeficientes de variación son muy pequeños. La existencia de un ritmo circadiano en la secreción de testosterona hace que se recomiende la determinación de TS entre las 8:00 y 10:00 de la mañana, y además la Sociedad Americana de Endocrinología recomienda su determinación en 3 días consecutivos⁷. La realidad clínica difiere radicalmente de la recomendación anterior, y debemos destacar que en la totalidad de las series analizadas se utilizaron ensayos quimioluminiscentes. En concreto, en 2 estudios se utilizó el método Inmulite, DPC Inc.^{6,9}, en 2 el método Elecsys, Roche Inc.^{11,14}, en 2 el método Architect, Abbot Inc.^{13,16}, en uno el método Advia-Centaur, Siemens Inc.¹². En otro estudio no se especificó el método¹⁵. Los ensayos quimioluminiscentes aplicados de forma directa se utilizan ampliamente, ya que se pueden automatizar en diversas plataformas; sin embargo, tienden a sobreestimar la concentración de testosterona, no están estandarizados y su coeficiente de variación es inaceptable, especialmente en niveles muy bajos. Por ello, la Sociedad Americana de Endocrinología desaconseja su utilización en mujeres, niños y varones sometidos a SA⁸. Esta recomendación está basada en algunos estudios que han comparado diversos ensayos quimioluminiscentes con un estándar basado en LC/GC MSMS²⁰⁻²³. En general, se ha observado distinto comportamiento de estos ensayos en función de los niveles de TS, y alguno de ellos ha mostrado mejor perfil de correlación en niveles bajos de TS; no obstante, todos los estudios desaconsejan su utilización. Recientemente, nuestro grupo ha comparado 2 ensayos quimioluminiscentes en pacientes con CP sometidos a SA y hemos podido observar muy distinto comportamiento. En concreto, el nivel medio de TS con uno de ellos se redujo un 77%. También se encontraron concentraciones por encima de 50 ng/dl entre el 0% y 25%, e inferiores a 20 ng/dl entre el 85% y 15% respectivamente²⁰.

Conclusiones

El nivel de evidencia científica que sostiene la determinación de TS durante la SA es bajo, y la utilización de ensayos quimioluminiscentes, en forma directa, en todos los estudios publicados, cuestiona la validez de los resultados. Aun con estas limitaciones creemos que la verificación de la eficacia de la SA es necesaria; por ello hoy es necesario establecer el nivel de castración de TS determinado con un método de cuantificación estandarizado y diseñar nuevos estudios que permitan confirmar el valor de su determinación durante la SA.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer I. The effect of castration, of oestrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res.* 1941;1:293-7.
2. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol.* 2014;65:467-79.
3. Hu R, Denmeade SR, Luo J. Molecular processes leading to aberrant androgen receptor signaling and castration resistance in prostate cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2010;5:753-64.
4. The leuprolide study group. Leuprolide versus diethylstilbestrol for metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.* 1984;311:1281-6.
5. Oefelein M, Feng A, Scolieri M, Feng MG, Scolieri A, Ricchiutti MJ, et al. Reassessment of the definition of castrate levels of testosterone: implications for clinical decision making. *Urology.* 2000;56:1021-4.
6. Morote J, Orsola A, Planas J, Trilla E, Raventós CX, Cecchini L, et al. Redefining clinically significant castration levels in patients with prostate cancer receiving continuous androgen deprivation therapy. *J Urol.* 2007;178:1290-5.
7. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guideline). Prostate Cancer, 2015. Disponible en: www.tri-kobe.org/nccn/guideline/prostate.
8. Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: An Endocrine Society position statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:405-13.
9. Rosner W, Vesper H. Towards excellence in testosterone testing: A consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:4542-8.
10. Perachino M, Cavalli V, Bravi F. Testosterone levels in patients with metastatic prostate cancer treated with luteinizing hormone-releasing hormone therapy: prognostic significance. *BJU Int.* 2010;105:648-51.
11. Pickles T, Hamm J, Morris WJ, Schreiber WE, Tyldesley S. Incomplete testosterone suppression with luteinizing hormone-releasing hormone agonists: Does it happen and does it matter. *BJU Int.* 2012;110:E500-7.
12. Dason S, Allard CB, Tong J, Shayegan B. Defining a new testosterone threshold for medical castration: Results from a prospective cohort series. *Can Urol Assoc J.* 2013;7:E263-7.
13. Bertaglia V, Tucci M, Fiori C, Aroasio E, Poggio M, Buttiglieri, et al. Effects of serum testosterone levels after 6 months of androgen deprivation therapy on the outcome of patients with prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 2013;11:325-30.e1.
14. Yasuda Y, Fujii Y, Yuasa T, Yamamoto S, Yonese J, Fukui I. Do testosterone levels have prognostic significance in patients with metastatic prostate cancer treated with combined androgen blockade. *Int J Urol.* 2015;22:132-3.
15. Klotz L, O'Callaghan C, Ding K, Toren P, Dearnaley D, Higano CS, et al. Nadir testosterone within first year of androgen-deprivation therapy (ADT) predicts for time to castration-resistant progression: A secondary analysis of the PR-7 trial of intermittent versus continuous ADT. *J Clin Oncol.* 2015;33:1151-6.
16. Kamada S, Sakamoto S, Ando K, Muroi A, Fuse M, Kawamura K, et al. Nadir testosterone after long-term follow-up predicts prognosis of prostate cancer patients treated with combined androgen blockade. *J Urol.* 2015;194:1264-70.
17. Tombal B. Appropriate castration with luteinising hormone releasing hormone (LHRH) agonists: What is the optimal level of testosterone? *Eur Urol Suppl.* 2005;4:14-9.

18. Morote J, Planas J, Salvador C, Raventós C, Catalán R, Reventós J. Individual variations of serum testosterone in patients with prostate cancer receiving androgen deprivation therapy. *BJU Int.* 2008;103:332–5.
19. Regis L, Planas J, Celma A, de Torres I, Ferrer R, Morote J. Comportamiento de la testosterona total y libre en suero como predictores del riesgo de cáncer de próstata y de su agresividad. *Actas Urol Esp.* 2015;39:573–81.
20. Morote J, Regis L, Planas J, Maldonado X, Carles J, Comas I, et al. Are chemiluminescent assays appropriate to measure serum testosterone in patients under androgen deprivation therapy? *Urology.* 2016. (accepted pending of publication).
21. Taieb J, Mathian B, Millot F, Patricot MC, Mathieu E, Queyrel N, et al. Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children. *Clin Chem.* 2003;49:1381–95.
22. Wang C, Catlin DH, Demers LM, Starcevic B, Swerdloff RS. Measurement of total serum testosterone in adult men: comparison of current laboratory methods versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:534–43.
23. Sikaris K, McLachlan RI, Kazlauskas R, de Kretser D, Holden CA, Handelsman DJ. Reproductive hormone reference intervals for healthy fertile young men: Evaluation of automated platform assays. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:5928–36.

The Journal of Urology

Free testosterone: a better surrogate than total testosterone to predict survival free of castration resistance.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Adult Urology Article
Full Title:	Free testosterone: a better surrogate than total testosterone to predict survival free of castration resistance.
First Author:	Lucas Regis
Corresponding Author:	Lucas Regis Vall d Hebron University Hospital Barcelona, Barcelona SPAIN
Corresponding Author E-Mail:	lucasregis@gmail.com
Corresponding Author's Institution:	Vall d Hebron University Hospital
Order of Authors:	Lucas Regis Jacques Planas, PhD Joan Carles, PhD Xavier Maldonado, PhD Inma Comas Roser Ferrer, PhD Juan Morote, PhD
Manuscript Region of Origin:	SPAIN
Keywords:	Prostate cancer, androgen deprivation therapy, testosterone, free testosterone
Manuscript Classifications:	40: Organs; 70: Nonoperative treatments; 10.150: Oncology; 40.210: Prostate; 70.120: Drug therapy; 70.180: Hormone therapy; 10: Medical topics
Abstract:	<p>Purpose: The optimal degree of testosterone suppression in patients with prostate cancer undergoing androgen deprivation therapy remains in question. Furthermore, serum free testosterone, which is the active form of testosterone, seems to correlate with intraprostatic testosterone. Here we compared free and total serum testosterone as predictors of survival free of castration resistance.</p> <p>Material and Methods: Total testosterone (chemiluminiscent assay, lower sensitivity 10 ng/dL) and free testosterone (analogue-ligand radioimmunoassay, lower sensitivity 0.05 pg/mL) were determined at six months of LHRH agonist treatment in 126 patients with prostate cancer. During a mean follow up of 67 months (9-120), 75 (59.5%) events of castration resistance were identified. Multivariate analysis and survival analysis according to total testosterone cutpoints of 50, 32, and 20 ng/dL, and free testosterone cutpoints of 1.7, 1.1, and 0.7 pg/mL were performed.</p> <p>Results: Metastatic spread was the most powerful predictor of survival free of castration resistance, HR: 2.09 (95%CI: 1.18-3.72), p=0.012. Gleason score, baseline PSA and PSA at 6 months were also independent predictors, but not free and total testosterone. After adjust the model by the metastatic status, free testosterone was found to be an independent predictor of survival free of castration resistance in the subset of patients without metastasis, HR: 2.12 (95%CI: 1.16-3.85), p=0.014. A free testosterone of 1.7 pg/mL was the lowest threshold showing significant differences, p=0.003.</p> <p>Conclusions: Free testosterone at six months of LHRH agonist treatment seems to be a better surrogate than total testosterone to predict castration resistance in no metastatic prostate cancer patients.</p>
Author Comments:	Dear Editor: Please find attached our manuscript entitled "Free testosterone: a better surrogate

	<p>than total testosterone to predict survival free of castration resistance", which we submit for your consideration for publication as an original article in the Journal of Urology. It is well known that the optimal degree of testosterone suppression in patients with prostate cancer undergoing androgen deprivation therapy remains in question. We previously have published the behavior of free testosterone that is the active form of testosterone in the diagnosis and prediction of high-grade disease. The advent of new agents represented by abiraterone acetate and enzalutamide, which target to adrenal or intraprostatic androgen biosynthesis and androgen signaling respectively, has retrieved interest in serum testosterone levels during androgen suppression. This work underlines that free testosterone at six month is a better surrogate than total testosterone to predict castration resistance in patients with no metastatic disease and this isoform can represent better the androgen activity in patients with advanced disease.</p> <p>All authors are aware of and agree to the submission and they have all contributed to the work described sufficiently to be named as authors. All authors declare that there isn't any financial interest or other conflicts of interest related with this manuscript. We look forward to your response.</p> <p>Best regards,</p>
<p>Suggested Reviewers:</p>	
<p>Opposed Reviewers:</p>	

March 31th, 2016

Dr Joseph A. Smith
Editor-in-Chief Journal of Urology

Dear Editor:

Please find attached our manuscript entitled “**Free testosterone: a better surrogate than total testosterone to predict survival free of castration resistance**”, which we submit for your consideration for publication as an original article in the Journal of Urology. It is well known that the optimal degree of testosterone suppression in patients with prostate cancer undergoing androgen deprivation therapy remains in question. We previously have published the behavior of free testosterone that is the active form of testosterone in the diagnosis and prediction of high-grade disease. The advent of new agents represented by abiraterone acetate and enzalutamide, which target to adrenal or intraprostatic androgen biosynthesis and androgen signaling respectively, has retrieved interest in serum testosterone levels during androgen suppression. This work underlines that free testosterone at six month is a better surrogate than total testosterone to predict castration resistance in patients with no metastatic disease and this isoform can represent better the androgen activity in patients with advanced disease.

All authors are aware of and agree to the submission and they have all contributed to the work described sufficiently to be named as authors. All authors declare that there isn't any financial interest or other conflicts of interest related with this manuscript.

We look forward to your response.

Best regards,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Juan Morote', enclosed within a large, stylized, horizontal oval shape.

Juan Morote M.D., Ph.D.
Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona. Spain jmorote@vhebron.net

2 **Free testosterone: a better surrogate than total testosterone to predict survival free**
3 **of castration resistance.**

4

5 **Abstract**

6 **Purpose:** The optimal degree of testosterone suppression in patients with prostate
7 cancer undergoing androgen deprivation therapy remains in question. Furthermore,
8 serum free testosterone, which is the active form of testosterone, seems to correlate with
9 intraprostatic testosterone. Here we compared free and total serum testosterone as
10 predictors of survival free of castration resistance.

11 **Material and Methods:** Total testosterone (chemiluminiscent assay, lower sensitivity
12 10 ng/dL) and free testosterone (analogue-ligand radioimmunoassay, lower sensitivity
13 0.05 pg/mL) were determined at six months of LHRH agonist treatment in 126 patients
14 with prostate cancer. During a mean follow up of 67 months (9-120), 75 (59.5%) events
15 of castration resistance were identified. Multivariate analysis and survival analysis
16 according to total testosterone cutpoints of 50, 32, and 20 ng/dL, and free testosterone
17 cutpoints of 1.7, 1.1, and 0.7 pg/mL were performed.

18 **Results:** Metastatic spread was the most powerful predictor of survival free of
19 castration resistance, HR: 2.09 (95%CI: 1.18-3.72), p=0.012. Gleason score, baseline
20 PSA and PSA at 6 months were also independent predictors, but not free and total
21 testosterone. After adjust the model by the metastatic status, free testosterone was found
22 to be an independent predictor of survival free of castration resistance in the subset of
23 patients without metastasis, HR: 2.12 (95%CI: 1.16-3.85), p=0.014. A free testosterone
24 of 1.7 pg/mL was the lowest threshold showing significant differences, p=0.003.

25 **Conclusions:** Free testosterone at six months of LHRH agonist treatment seems to be a
26 better surrogate than total testosterone to predict castration resistance in no metastatic
27 prostate cancer patients.

28

29 **Introduction**

30 After Huggins and Hodges reported the hormone dependence of PCa in 1941 ¹, ADT
31 has become the standard therapy for advanced disease ^{2,3}. Surgical or medical
32 castration, by the use of LHRH agonists or antagonist, reduce serum testosterone to the
33 named castration level ². These hormonal changes reduce tumor burden, alleviate
34 symptoms, and prolong survival. Although there is an inevitable progression to CRPC
35 due to a selection pressure exerted by the ADT that contributes to the emergence of PCa
36 cells that can proliferate despite low level of testosterone ^{4,5}.

37 The measurement of serum TT is recommended in clinical guidelines to evaluate the
38 efficacy of therapy against LHRH and to confirm the castration resistance status ³.
39 Before nineties, serum testosterone was measured with direct radioimmunoassays,
40 which were not accurate below 50 ng/dL. This was the reason why less than 50 ng/dL
41 was adopted as the castrate level. Therefore this level was defined more by
42 measurement method derived from the use of old assays than by evidence ⁶. The
43 availability of new measuring techniques and new therapies targeting androgen
44 synthesis and androgen receptor activity has challenged this definition. The castrate
45 level of serum testosterone was reassessed by Oefelein et al in 20 ng/dL, using a
46 chemiluminiscent assay in a cohort of 35 patients subjected to surgical castration ⁷.
47 However, the optimal degree of testosterone suppression following castration remains in
48 question. Ineffective testosterone suppression after a period of adequate suppression is
49 currently poorly recognized and may result in increased PCa mortality. Thus, it seems
50 important redefining the threshold of testosterone in patients under ADT to achieve
51 better clinical results ⁸. Furthermore, only about 1% to 2% of TT circulates as FT,
52 constituting the active isoform able to diffuse into the cells and bind to androgen

53 receptor after their conversion in dihydrotestosterone. This theory has been largely
54 accepted as the free hormone hypothesis ⁹. Vermeulen et al showed equivalence
55 between calculated levels of FT and certain concentrations of the hormone determined
56 by means of equilibrium dialysis ¹⁰. However, estimation methods are highly dependent
57 on TT, sex hormone binding globulin and albumin concentrations. In addition,
58 variations in body mass index and the plasma protein concentration can alter the
59 estimated results ¹¹.

60 We hypothesized that determined serum FT correlates itself with the intraprostatic
61 testosterone better than TT, and therefore the efficacy of ADT is better predicted by
62 serum FT monitoring.

63 The current study compares TT and determined FT serum levels at six months of LHRH
64 agonist treatment as predictors of SFCR.

65

66 **Material and methods**

67 *Participants and design.*

68 This is a retrospective study including 126 patients with histologically confirmed PCa,
69 that started continuous ADT with LHRH agonist between 2005 and 2010, in whom
70 serum TT and FT were determined at six months of treatment. All patients received
71 one-month course of bicalutamide 50 mg/d, 14 days before and 14 after the first LHRH
72 agonist administration and thereafter an LHRH agonist injection every three months.
73 ADT was the first treatment of PCa in 97 patients (77%), due to its metastatic spread at
74 diagnosis in 42 patients, and due to a very high risk of microscopic metastatic disease
75 (T1-4 N0-2 M0 and PSA >50 ng/mL) in 55. In the remaining 29 patients (33%) LHRH
76 agonist treatment was administered after biochemical failure of primary treatment,
77 surgery and/or radiation therapy. The end-point of this study was SFCR, which was
78 observed in 75 patients (59.5%) during a mean follow-up of 67 months (9-120). Clinical
79 progression and specific survival were not considered end-points due to their low rate of
80 events during the follow up, 16.7% and 7.9% respectively. Table 1 summarizes clinical
81 characteristics of this cohort study.

82

83 *TT and FT serum determinations.*

84 Blood was extracted between 8:00 and 10:00 and two aliquots of serum were prepared.
85 TT was measured by a solid-phase, competitive chemiluminiscent enzyme
86 immunoassay (DPC Inc. Los Angeles CA, USA) with lower limit of quantification of
87 10 ng/dL. FT was measured by an analogue-ligand radioimmunoassay (DPC Inc, Los
88 Angeles CA, USA) with lower limit of quantification of 0.05 pg/mL.

89

90 *Definition of castration resistance.*

91 In all cases CR was defined according to PCWG2 PSA progression, defined as a rising
92 PSA greater than 2 ng/mL with a rise been at least 25% over the nadir and confirmed by
93 second PSA rise at least three weeks later. Moreover, serum TT should be lower than 50
94 ng/dL³.

95

96 *Statistical analysis.*

97 An initial multivariate Cox regression proportional hazards model including baseline
98 PSA, Gleason score, clinical stage (metastatic vs no metastatic), and PSA, TT and FT at
99 six months was performed to determine the independent predictive role of TT and FT at
100 six months. Thereafter the model was adjusted to the baseline clinical stage because it
101 was the most relevant predictor of CR. Kaplan-Meier curves, and Log-rank and Breslow
102 test were used to analyze SFCR according to pre-defined cut-off levels of 50 ng/dl, 32
103 ng/dL, and 20 ng/dL of TT and their equivalent FT levels of 1.7 pg/mL, 1.1 pg/mL and
104 0.7 pg/mL. SPSS.v 20 (SPSS, Inc, Chicago, IL) was used to perform the statistical
105 analysis.

106

107 **Results**

108 An initial multivariate analysis that included baseline serum PSA, Gleason score,
109 clinical stage (metastatic versus no metastatic), and serum PSA, TT and FT at six month
110 of LHRH agonist treatment, showed that metastatic disease was the most powerful
111 predictor of CR, HR: 2.09 (95%CI: 1.18-3.72), p=0.012. The Gleason score, baseline
112 PSA and PSA at six month of ADT were also independent predictors of CR, Table 2.
113 After adjust the model by the metastatic status of the disease, FT was found as an
114 independent predictor of CR in the subset of patients without metastatic spread, HR:
115 2.12 (95%CI: 1.16-3.85), p=0.014. However, TT was not found as a predictor of CR
116 even in patients with or without metastases, Table 3.

117 The survival analysis until CR in the subset of patients without metastases, according to
118 previously established cut-point levels of TT and FT is presented in Fig. 1. We did not
119 observe a different SFCR according 50, 32 or 20 ng/dL of TT. However, the subset of
120 patients with FT above 1.7 pg/mL had a mean SFCR of 60.4 months (95%CI: 41.3-
121 79.5) and a median survival of 43.1 months (95%CI: 31.5-54.7). The mean SFCR for
122 those patients having FT below 1.7 pg/mL were 92.3 months (95%CI: 82.9-101.7) and
123 at the median SFCR was not reached at 120 months of follow-up, p =0.003. Lower cut-
124 point levels of FT (1.1 pg/mL or 0.7 pg/mL), were not associated with different SFCR.

125

126 **Discussion**

127 The advent of new agents represented by abiraterone acetate and enzalutamide, which
128 target to adrenal or intraprostatic androgen biosynthesis and androgen signaling
129 respectively, has retrieved interest in serum testosterone levels during ADT ¹². The
130 castrate level of serum TT considered by the regulatory authorities is still 50 ng/dL ³,
131 although different authors had underlined that lower levels of androgen would correlate
132 with better outcomes ^{7, 8, 13-19}.

133 In 2007, Morote et al. established in 32 ng/dL the lowest level of serum TT with clinical
134 impact in SFCR. The authors retrospectively analyzed the levels of serum TT at 6, 12
135 and 18 months of LHRH agonist treatment, in 73 PCa patients without metastasis. They
136 identified a significant lower SFCR in those patients who were identified to have any
137 microsurge of TT over 32 ng/dL ¹⁴. Furthermore this study suggested that small
138 breakthrough elevations of TT between 20 ng/dL y 32 ng/dL had not clinical impact on
139 SFCR, and thus it was discredit the myth related to the level of TT and ADT: “the
140 lowest the best” ¹³. In the present study we have failed to find any cut-point of TT
141 serum, determined at 6 months of ADT, able to predict CR.

142

143 Perachino et al. in 2009 studied 129 metastatic patients under ADT during a mean
144 follow-up of 47 months. Similar to our study, they determined serum TT at 6 months of
145 ADT. These authors found that serum TT was an independent predictor of CSS in their
146 logistic regression analysis that included the Gleason score, serum PSA and TT ¹⁵.
147 These data contrast with those reported by Bertaglia et al. who failed to show a
148 significant association between CSS and serum TT levels in patients treated with ADT
149 due to biochemical failure after primary treatment ¹⁶. Nevertheless these authors
150 confirmed that serum TT had prognostic value in patients with locally advanced disease

151 or metastasis, in concordance with other published results ^{16,17}. In a different set of
152 patients, Pickles et al in 2012 published the unique study that analyzes the serum TT
153 breakthroughs impact in the biochemical progression among patients treated with ADT,
154 during three years and radiation therapy. This retrospective study concluded that the risk
155 of progression at five years follow up was superior when there were breakthroughs over
156 than 20 ng/dL and even higher in those upper than 50 ng/dL ⁸. On the other hand, some
157 authors have published conflicting data in which association between serum TT levels
158 and SFCR or OS was not found ²⁰. Those studies are summarized on table 4.

159

160 It seems worldwide accepted that the optimal level of serum TT during ADT should be
161 the lowest achievable one, although rigorous testing of this hypothesis is needed.
162 However, there is a lack of high-level evidence to support that the lowest testosterone
163 level should be a primary goal of castration. Some research in this area have focused on
164 lowering serum TT, but a theoretically better determinant of male hormone activity such
165 as serum FT have not yet been tested as prognostic marker of CR. The present study
166 have shown that patients with no metastatic PCa with serum FT level, at six months of
167 ADT, lower than 1.7 pg/mL have longer SFCR than those who not achieve this level.
168 This could be explained by the free hormone hypothesis that defends that the active
169 form of testosterone is its free isoform ^{9,21}. Serum FT levels, although challenging to be
170 measured, may reflect better than TT levels the ongoing androgenic signaling within
171 PCa cells. Despite better understanding of testosterone metabolism and its relationship
172 with PCa, current guidelines remain vague regarding ongoing monitoring of
173 testosterone due to a lack of well-designed studies ²². Recent scientific evidence
174 suggests that the serum FT isoform correlates itself better with the intraprostatic

175 androgen profile than serum TT ¹². Furthermore it is widely accepted that hormone
176 intraprostatic environment influences the PCa biology ²³.

177

178 To our knowledge, this is the first study to explore the prognosis role of serum FT
179 levels during ADT as a main end-point. However, lower FT levels have been previously
180 correlated with improved survival in secondary analyzes ^{24,25}. Other previous studies
181 widely discord in the prognostic role of serum TT in patients undergoing castration. The
182 varied spectrum of results obtained until now can be explained by I. The retrospective
183 design of most of studies, II. The heterogeneous profile of clinical stages included, III.
184 The different form of evaluate the level of TT, i.e. mean, nadir, microelevation and
185 different cut-points, IV. The different ADT schemes (castration versus complete
186 androgen suppression), V. Maybe an inappropriate method to determine serum TT.

187

188 It seems natural that future insights in this research area should be perform prospective
189 studies to determine FT performance in predicting PCa outcomes similarly to those
190 studies that have focused on TT: to achieve the clinical impact of hormone
191 breakthroughs ^{8,14,17}, to determine prognosis nadir levels ^{18,19} and to correlate hormone
192 patterns with cancer specific outcomes ^{15,16,20}. Limitations of our study are the
193 retrospective design, the short follow-up, the low rate of events to consider specific
194 survival as an endpoint and, finally, the possible inadequate assays used to determine
195 TT and FT at low levels ^{11,26,27}.

196

197 The findings of our study can serve to hypothesis generation and to design prospective
198 studies to define what profile of hormone monitoring PCa patients undergoing ADT

199 need and its consequences.

200

201 **Conclusions**

202 The role of serum TT measurement during ADT remains unclear and here we have

203 generate the hypothesis that FT determination at six month is a better surrogate than TT

204 to predict CRPC in patients with no metastatic disease. Patients who achieve a FT level

205 below 1.7 pg/mL will have longer SFCR than those who do not reach this level.

- 207 1. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer I. The effect of castration, of
208 estrogen, and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic
209 carcinoma of the prostate. *Cancer Res* 1941; **1**: 293.
- 210 2. Nishiyama T. Serum testosterone levels after medical or surgical androgen
211 deprivation: a comprehensive review of the literature. *Urol Oncol* 2014; **32**: 38
212 e17.
- 213 3. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J et al. EAU guidelines on prostate cancer.
214 Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer.
215 *Eur Urol* 2014; **65**: 467.
- 216 4. Hussain M, Goldman B, Tangen C et al. Prostate-specific antigen progression
217 predicts overall survival in patients with metastatic prostate cancer: data from
218 Southwest Oncology Group Trials 9346 (Intergroup Study 0162) and 9916. *J Clin*
219 *Oncol* 2009; **27**: 2450.
- 220 5. Djavan B, Eastham J, Gomella L et al. Testosterone in prostate cancer: the
221 Bethesda consensus. *BJU Int* 2012; **110**: 344.
- 222 6. Wilke TJ, Utley DJ. Total testosterone, free-androgen index, calculated free
223 testosterone, and free testosterone by analog RIA compared in hirsute women and
224 in otherwise-normal women with altered binding of sex-hormone-binding
225 globulin. *Clin Chem* 1987; **33**: 1372.
- 226 7. Oefelein MG, Feng A, Scolieri MJ et al. Reassessment of the definition of castrate
227 levels of testosterone: implications for clinical decision making. *Urology* 2000;
228 **56**: 1021.
- 229 8. Pickles T, Hamm J, Morris WJ et al. Incomplete testosterone suppression with
230 luteinizing hormone-releasing hormone agonists: does it happen and does it

- 231 matter? BJU Int 2012; **110**: E500.
- 232 9. Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical
233 model. *Endocr Rev* 1989; **10**: 232.
- 234 10. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods
235 for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;
236 **84**: 3666.
- 237 11. Shea JL, Wongt PY, Chen Y. Free testosterone: clinical utility and important
238 analytical aspects of measurement. *Adv Clin Chem* 2014; **63**: 59.
- 239 12. Hara N, Nishiyama T. Androgen metabolic pathway involved in current and
240 emerging treatment for men with castration resistant prostate cancer: intraprostatic
241 androgens as therapeutic targets and endocrinological biomarkers. *Curr Drug*
242 *Targets* 2014; **15**: 1215.
- 243 13. Tombal B. Appropriate castration with luteinising hormone releasing hormone
244 (LHRH) agonists: what is the optimal level of testosterone? *Eur Urol Suppl* 2005;
245 **4**: 14.
- 246 14. Morote J, Orsola A, Planas J et al. Redefining clinically significant castration
247 levels in patients with prostate cancer receiving continuous androgen deprivation
248 therapy. *J Urol* 2007; **178**: 1290.
- 249 15. Perachino M, Cavalli V, Bravi F. Testosterone levels in patients with metastatic
250 prostate cancer treated with luteinizing hormone-releasing hormone therapy:
251 prognostic significance? *BJU Int* 2010; **105**: 648.
- 252 16. Bertaglia V, Tucci M, Fiori C et al. Effects of serum testosterone levels after 6
253 months of androgen deprivation therapy on the outcome of patients with prostate
254 cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2013; **11**: 325e1.
- 255 17. Dason S, Allard CB, Tong J et al. Defining a new testosterone threshold for

- 256 medical castration: Results from a prospective cohort series. *Can Urol Assoc J*
257 2013; **7**: E263.
- 258 18. Kamada S, Sakamoto S, Ando K et al. Nadir Testosterone after Long-Term
259 Followup Predicts Prognosis in Patients with Prostate Cancer Treated with
260 Combined Androgen Blockade. *J Urol* 2015; **194**: 1264.
- 261 19. Klotz L, O'Callaghan C, Ding K et al. Nadir testosterone within first year of
262 androgen-deprivation therapy (ADT) predicts for time to castration-resistant
263 progression: a secondary analysis of the PR-7 trial of intermittent versus
264 continuous ADT. *J Clin Oncol* 2015; **33**: 1151.
- 265 20. Yasuda Y, Fujii Y, Yuasa T et al. Do testosterone levels have prognostic
266 significance in patients with metastatic prostate cancer treated with combined
267 androgen blockade. *Int J Urol* 2015; **22**: 132.
- 268 21. Matsumoto AM, Bremner WJ. Serum testosterone assays--accuracy matters. *J*
269 *Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 520.
- 270 22. Rove KO, Crawford ED, Perachino M et al. Maximal Testosterone Suppression in
271 Prostate Cancer-Free vs Total Testosterone. *Urology* 2014; **83**:1217.
- 272 23. Mohler JL. Castration-recurrent prostate cancer is not androgen-independent. *Adv*
273 *Exp Med Biol* 2008; **617**: 223.
- 274 24. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A et al. Abiraterone and increased survival in
275 metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 2011; **364**:1995.
- 276 25. Levell MJ, Siddall JK, Rowe E et al. Relationship of testosterone, sex hormone
277 binding globulin, and calculated free testosterone to subsequent clinical progress
278 in patients with carcinoma of the prostate treated with bilateral orchidectomy or
279 estrogens. *Prostate* 1987; **11**: 17.
- 280 26. van der Sluis TM, Meuleman EJ, van Moorselaar RJ et al. Intraprostatic

281 testosterone and dihydrotestosterone. Part II: concentrations after androgen
282 hormonal manipulation in men with benign prostatic hyperplasia and prostate
283 cancer. *BJU Int* 2012; **109**:183.

284 27. Morote J, Planas J, Salvador C et al. Individual variations of serum testosterone in
285 patients with prostate cancer receiving androgen deprivation therapy. *BJU Int*
286 2009; **103**: 332.

287

288

289 **Standard Abbreviations**

290 PCa = prostate cancer

291 ADT = androgen deprivation therapy

292 CRPC = castrate-resistant prostate cancer

293 TT = total testosterone

294 FT = free testosterone

295 LHRH = luteinizing hormone-releasing hormone

296 SFCR = survival free of castration resistance

297 PSA = prostate-specific antigen

298 PCWG2 = Prostate Cancer Work Group 2

299 HR = hazard ratio

300 CI = confidence interval

301 CSS = cancer-specific survival

302 OS = overall survival

303 CAB = complete androgen blockage

304 RIA = radioimmunoanalysis

305

306 **Tables and figure legends:**

307

308 Table 1. Demographic and clinical characteristics of the population included in the
309 study.

310

311 Table 2. Multivariate analysis of predictive factors of castration resistance in overall
312 patients.

313

314 Table 3. Multivariate analysis of predictors of castration resistance according to metastatic
315 status at baseline.

316

317 Table 4. Studies that have analyzed the influence of testosterone serum levels on
318 clinical outcomes of PCa patients subjected to androgen suppression.

319

320 Fig. 1 Analysis of survival free of castration resistance in the subset of patients with
321 no metastatic PCa, according to different cut point levels of serum FT and TT
322 determined at six month of LHRH agonist treatment. (A) FT: 1.7 pg/mL, (B) FT: 1.1
323 pg/mL; (C) FT: 0.7 pg/mL. (D) TT: 50 ng/mL, (E) TT: 32 ng/dL, (F) TT: 20 ng/dL.

324

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the population included in the study.

Patients, no	126
Age ¹ , years	71.9 (54-92)
Baseline PSA ² , ng/mL	39.4 (0.9-8254)
Clinical stage, no (%)	
T1-2 N0 M0	14 (11.1)
T3-4 N0-2 M0	70 (55.6)
T1-4 N0-1 M1	42 (33.3)
TT ³ , ng/dL	20 (10.0-93.0)
FT ⁴ , pg/mL	1.0 (0.05-3.10)
Primary treatment, no (%)	
RP ⁵	14 (11.1)
RT ⁶ +ADT ⁷	15 (11.9)
ADT ⁷	97 (77.0)

¹Mean value (range); ²Median value (range); ³TT: total testosterone, Median value (range); ⁴FT: free testosterone, Median value (range); ⁵RP: radical prostatectomy; ⁶RT: radiation therapy; ⁷ADT: androgen deprivation therapy;

Table 2. Multivariate analysis of predictive factors of castration resistance in overall patients.

Variable	OR⁵	95% CI⁶	p Value
Age, years	1.016	0.986-1.046	0.295
Baseline PSA, ng/mL	1.001	1.001-1.805	0.027
Gleason score	1.461	1.183-1.665	0.001
Clinical stage (M1 ¹ vs M0 ²)	2.094	1.179-3.721	0.012
PSA at 6 months, ng/mL	1.045	1.027-1.063	0.001
TT ³ at 6 months, ng/dL	1.012	0.985-1.030	0.165
FT ⁴ at 6 months, pg/mL	0.968	0.581-1.612	0.900

¹M1: presence of metastasis; ²M0: absence of metastasis; ³TT: total testosterone; ⁴FT: free testosterone; ⁵OR: Odds Ratio; ⁶CI: confidence interval.

Table 3. Multivariate analysis of predictors of castration resistance according to metastatic status at baseline.

Variable	Patients M0 ² (n = 84)		Patients M1 ¹ (n = 42)	
	OR ⁵ (95% CI ⁶)	p Value	OR ⁵ (95% CI ⁶)	p Value
Age, years	1.019 (0.973-1.068)	0.421	1.007 (0.965-1.051)	0.746
Baseline PSA, ng/mL	1.002 (1.000-1.004)	0.027	1.000 (0.999-1.000)	0.092
Gleason score	1.341 (1.035-1.737)	0.026	1.430 (0.874-2.339)	0.154
PSA at 6 months, ng/mL	1.073 (1.044-1.103)	0.001	1.039 (1.016-1.062)	0.001
TT ³ at 6 months, ng/dL	1.005 (0.984-1.026)	0.628	1.027 (0.996-1.059)	0.186
FT ⁴ at 6 months, pg/mL	2.115 (1.163-3.845)	0.014	1.017 (0.814-1.341)	0.105

¹M1: presence of metastasis; ²M0: absence of metastasis; ³TT: total testosterone; ⁴FT: free testosterone; ⁵OR: Odds Ratio; ⁶CI: confidence interval.

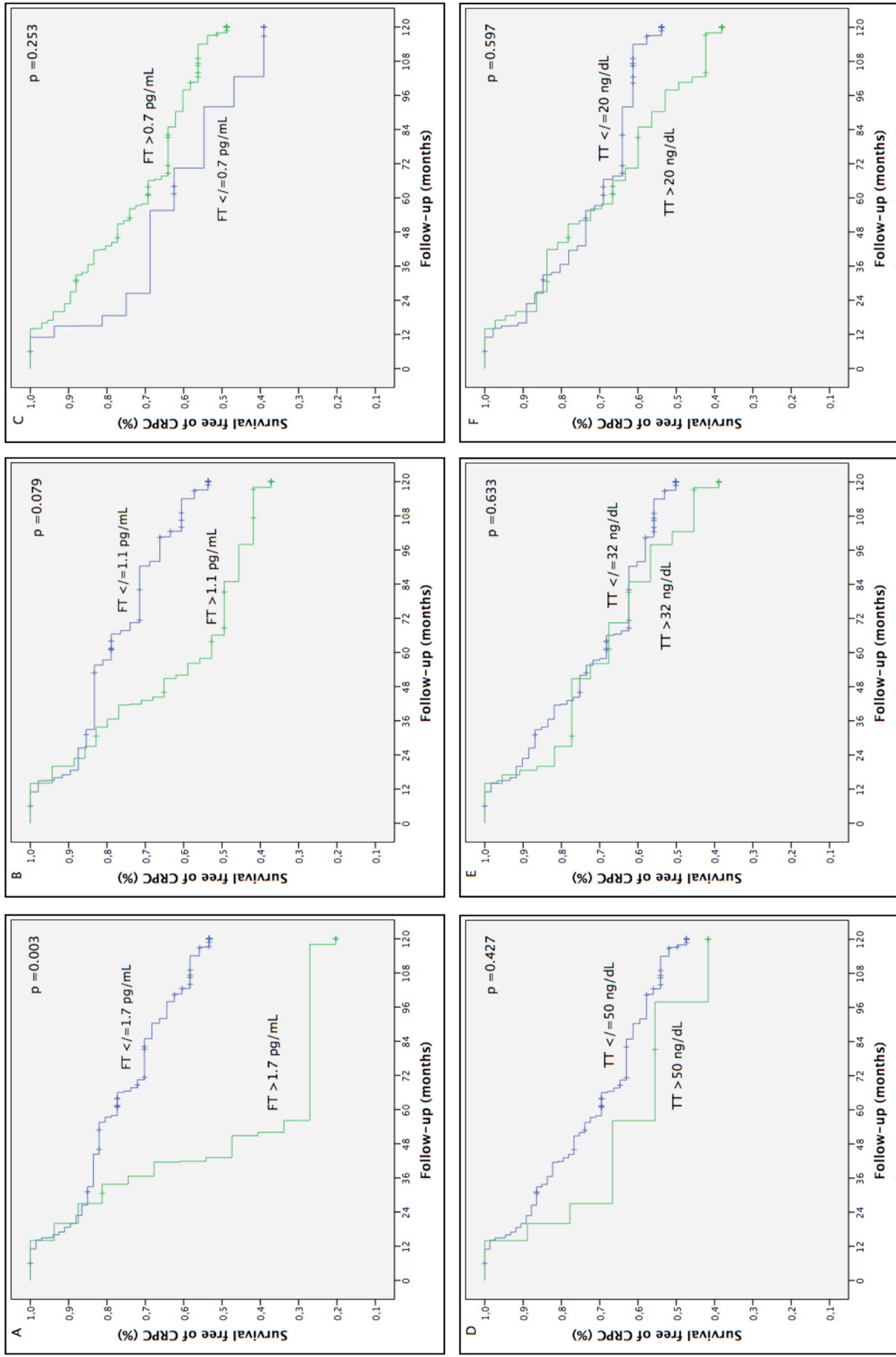
Table 4

Table 4 – Studies that have analyzed the influence of testosterone serum levels on clinical outcomes of PCa patients subjected to androgen suppression.

Author and year	No of pts	Clinical stage	Treatment	Time of testosterone determinations	End points	Observations and results
Morote et al, 2007	73	LA ² 50; BP ⁴ 23	LHRH agonist 45 CAB ⁷ 28	At 6, 12, and 18	PFS ⁵	32 ng/mL was the minimal cut-off T with impact on PFS ⁵ . If microsurgies over 50 ng/dL, better PFS ⁵ if receiving bicalutamide.
Perachino et al, 2009	129	M ³ 129	LHRH agonist 129	Every 3 months	OS ⁶	Lower T at 6 months predicted higher OS ⁶ in multivariate analysis.
Pickles et al, 2012	2196	All L ¹ or LA ²	RDT ⁸ plus LHRH agonist 2-3y	Serial, mean 2 (1-17)	PFS ⁵	Microsurgies from 1.1 to 1.7 nmol/L predicted 58% PFS ⁵ at 5 years vs 78% if not.
Dason et al, 2013	32	M ³ 14; LA ² 5; BP ⁴ 13	LHRH agonist or antagonist	Every 3 months	PFS ⁵	Men with microsurgies over than 50 ng/mL excluded. T at 9 months lower than 32 ng/dL better PFS ⁵ . Mean T during the first year lower that 32 ng/dL better PFS ⁵ .
Bertaglia et al, 2013	153	M ³ 51 BP ⁴ 99	LHRH agonist	At 6 months	PFS ⁵ and OS ⁶	T at 6 months < 20 ng/dL better OS ⁶ . T at 6 months < 20 vs 20-50 vs >50 ng/dL related to PFS ⁵ .
Yasuda et al, 2014	69	M ³ 69	CAB ⁷	Every 3-6 months	PFS ⁵ and OS ⁶	Mean T during follow up not related with PFS ⁵ or OS ⁶ .
Klotz et al, 2015	626	All BP ⁴	LHRH agonist	Every 3 months during the first year	PFS ⁵ and OS ⁶	Nadir T < 0.7 nmol/L higher time to PFS ⁵ and OS ⁶ . Microsurgies >1.7 lower time to PFS ⁵ and OS ⁶ .
Kamada et al, 2015	225	L ¹ 70; LA ² 51; M ³ 104	CAB ⁷	Every 3 months	PFS ⁵ and OS ⁶	Nadir T during follow up < 20 ng/dL and 6 months T < 20 ng/dL better OS ⁶ but no relationship with PFS ⁵ . Only 12% of mortality in this series.
Regis et al, 2015	126	L ¹ 64; LA ² 20; M ³ 42	LHRH agonist 126	Every 6 months	PFS ⁵	1.7 pg/ml was the minimal cut-off free testosterone with impact on PFS ⁵ at 6 months after ADT initiation.

¹L: localized; ²LA: locally advanced; ³M: metastatic; ⁴BP: biochemical progression after RDT or radical prostatectomy; ⁵PFS: progression free survival; ⁶OS: overall survival; ⁷CAB: complete androgen blockade; ⁸RDT: radiotherapy.

Figure 1.



Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

6. DISCUSIÓN

Históricamente, la testosterona ha sido asociada al diagnóstico del cáncer de próstata, a su agresividad y ha sido utilizada en el manejo del paciente con enfermedad avanzada. Charles Huggins en su trabajo "*Studies on Prostate Cancer*", publicado en *Cancer Research* en 1941, concluyó que el cáncer de próstata era "activado por inyecciones de testosterona" (Huggins and Hodges, 1941). Dicha línea de investigación le confirió el premio Nobel en 1966. ¿Pero cuán fiable era la conclusión de Huggins acerca de los riesgos de la inyección de testosterona? En su trabajo, apenas tres hombres recibieron testosterona durante 14 días, los resultados de dos pacientes fueron publicados y el tercer había sido previamente castrado. Su conclusión, por lo tanto, estaba basada en apenas un único paciente tratado por 14 días. Aunque clásicamente se admitió que a mayores concentraciones de testosterona, mayor el riesgo de cáncer y mayor agresividad, la evidencia científica no permite confirmar una asociación directa.

Un metanálisis realizado en 2008 que incluyó 18 estudios con un total de 3886 casos y 6438 controles concluyó que no era posible establecer una correlación entre los niveles séricos de distintas hormonas esteroideas analizadas y el riesgo de cáncer de próstata. En diez de estos estudios se analizó la testosterona total y libre calculada, los autores argumentan que la ausencia de relación entre diagnóstico de cáncer de próstata y niveles de testosterona total y libre podría deberse a la falta de correlación entre la concentración de DHT intraprostática y los niveles séricos de la hormona. Además los trabajos utilizaron la testosterona libre calculada, método con baja precisión y inherentes limitaciones. En este mismo metanálisis se encontró una relación inversa entre la concentración sérica de SHBG y el riesgo de cáncer de próstata. El riesgo relativo de neoplasia de próstata se redujo un 14% al comparar los varones cuyo nivel de SHBG estuvo por debajo del percentil 20 y por encima del percentil 80 (Roddam *et al.*, 2008).

La isoforma libre de la hormona determinada en sangre refleja mejor el ambiente androgénico intraprostático y la relación con el receptor androgénico de las células neoplásicas (Matsumoto and Bremner, 2004). En nuestro estudio encontramos una mayor asociación entre los niveles bajos de testosterona libre y la detección del cáncer de próstata que la concentración de la testosterona total. Sin embargo, la habilidad de la isoforma libre de la hormona como prueba diagnóstica ha sido limitada. No por ello nuestros resultados carecen de relevancia. Es conocida la insuficiente capacidad predictiva de las principales pruebas utilizadas actualmente en el cribado del cáncer de

próstata (Schröder *et al.*, 2009; Andriole *et al.*, 2009; Moyer and U.S., 2012). En este ámbito, la detección de un marcador sérico no costoso que pudiera mejorar la selección de los pacientes candidatos a la biopsia, disminuiría la morbilidad al reducir el número de biopsias innecesarias. La testosterona libre determinada en suero podría, de esta manera, formar parte de nomogramas para identificación de pacientes en mayor riesgo de padecer de cáncer de próstata.

Según algunos autores, el ambiente con bajos niveles de testosterona puede promover la 'desdiferenciación' de las células neoplásicas, resultando en tumores más agresivos debido a su relativa independencia hormonal (Morgentaler, 2007). El presente estudio no ha podido encontrar una relación entre la agresividad tumoral y la testosterona sérica libre o total. Aunque la fracción libre puede representar una mejor ventana a la actividad androgénica que la testosterona total (Matsumoto and Bremner, 2004; Mendel, 1989), actualmente no existe ningún estudio que compruebe si la sangre periférica representa el complejo metabolismo intraprostático. Además, la definición de agresividad tumoral (riesgo D'Amico, suma Gleason) se basa en los resultados de biopsias prostáticas. Pese a que son representativas, no pueden ser consideradas la verdad absoluta acerca de la anatomía patológica de la glándula, puesto que son el resultado de un muestreo aleatorio de cilindros. Probablemente el análisis de piezas de prostatectomías radicales permitiría añadir fiabilidad al análisis, aunque su realización queda limitada por las posibles indicaciones de cirugía radical y las características de cada paciente.

Actualmente es conocido que la actividad del receptor androgénico queda intacta a pesar de bajos niveles de testosterona (Rove *et al.*, 2014). Con ese principio, mantener bajos los niveles de testosterona sigue siendo el mantra de la práctica clínica durante la terapia de deprivación androgénica, que utiliza la testosterona total sérica y el PSA como determinantes de la eficacia en ensayos clínicos y en la clínica habitual. La evidencia clínica sugiere que el nivel óptimo de castración en el paciente con enfermedad avanzada debería ser el menor valor de testosterona determinable, sin embargo es necesaria una validación rigurosa de esta hipótesis (Reis, 2012). Desde que Oefelein *et al.* publicó un valor mediano de testosterona total de 15 ng/dL tras castración quirúrgica y recomendó adoptar 20 ng/dL como valor de referencia durante la deprivación androgénica, distintos trabajos han corroborado que los bajos niveles de testosterona se asocian a mejores resultados en el seguimiento (Oefelein *et al.*, 2000; Morote *et al.*, 2007) (Perachino *et al.*, 2010; Pickles *et al.*, 2012; Dason *et al.*, 2013; Bertaglia *et al.*, 2013; Yasuda *et al.*, 2015;

Klotz *et al.*, 2015; Kamada *et al.*, 2015). Sin embargo, debido a la dificultad metodológica de diseñar ensayos clínicos, existe una carencia de evidencia científica de nivel 1 que soporte esa teoría. Estudios recientes han señalado la falta de correlación lineal entre testosterona total y PSA en pacientes bajo tratamiento con análogos de la LHRH, contestando la equivalencia de las diferentes formas de castración farmacológica. La testosterona total probablemente no representa la exposición real a la testosterona libre (Rove *et al.*, 2014). Nuestro estudio demostró que la isoforma libre de la testosterona es un mejor predictor de supervivencia libre de resistencia a la castración que la testosterona total en pacientes no metastásicos a los 6 meses de deprivación androgénica. Nuestros resultados sugieren que la determinación de la testosterona libre para control del paciente en deprivación androgénica permitiría identificar aquellos con mayor riesgo de resistencia a la castración (testosterona libre >1.7 pg/mL se asoció con una supervivencia libre de resistencia a la castración [SLRC] inferior). El cambio precoz del análogo de LHRH o añadir anti-andrógenos a la terapia de deprivación androgénica con el objetivo de alcanzar cifras de testosterona libre inferiores al corte identificado, podría mejorar la evolución clínica de este grupo de pacientes.

Pese a la muestra razonablemente amplia utilizada en este proyecto, es necesario tener en cuenta algunas limitaciones. En primer lugar el carácter retrospectivo de parte del análisis confeccionado y su sesgos inherentes. Además, se trata de una experiencia unicéntrica, lo que confiere limitaciones en la extrapolación de los resultados a otras poblaciones. En segundo lugar, el carácter heterogéneo del cáncer de próstata juega un papel crucial en la interpretación de los resultados. El resultado de una biopsia en un momento dado y su correlación con el perfil hormonal, puede no ser reproducible si se realizase la biopsia en otro momento de la historia natural de la enfermedad. En tercer lugar, la biopsia de próstata ofrece limitaciones en el estudio de la relación histológica y hormonal dado que su fiabilidad no es absoluta. Por último, cabe enfatizar que los métodos de determinación de la testosterona libre y total, aunque son precisos, presentan una variabilidad intra y inter-ensayo conocida. Además, pese a que la quimioluminiscencia es el método universalmente utilizado en la práctica clínica, la Sociedad Americana de Endocrinología (Rosner *et al.*, 2017) recomienda la cromatografía líquida o de gases con espectrometría de masas como método de elección en pacientes con bajos niveles séricos de testosterona.

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

7. CONCLUSIONES

1. Niveles séricos bajos de testosterona total o de testosterona libre incrementan el riesgo de detección de cáncer de próstata en pacientes con sospecha basada en la elevación del PSA y/o tacto rectal alterado. La testosterona libre sérica tiene un mejor rendimiento que la testosterona total como predictor de cáncer de próstata. No obstante, su eficacia diagnóstica no es suficientemente alta como para ser utilizada de manera aislada.
2. Los niveles séricos de testosterona total o libre no se asociaron con la agresividad tumoral.
3. La testosterona sérica libre determinada a los 6 meses de deprivación androgénica fue un predictor independiente de la supervivencia libre de resistencia a la castración en pacientes no diseminados, mientras que la testosterona total no lo fue.
4. El nivel de 1,7 pg/mL fue el menor valor de testosterona sérica libre que permitió establecer diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia libre de resistencia a la castración.

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

8. BIBLIOGRAFÍA

Andriole GL, Bostico DG, Brawley OW, Gomella LG, Marberger M, Montorsi F et al. Effect of dutasteride on the risk of prostate cancer. *N Engl J Med.* 2010; **362**: 1192-1202.

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**: 1310-1319.

Andriole GL, Guess HA, Epstein JI, Wise H, Kadmon D, Crawford ED et al. Treatment with finasteride preserves usefulness of prostate-specific antigen in the detection of prostate cancer: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial.

PLESS Study Group. Proscar Long-term Efficacy and Safety Study. *Urology.* 1998; **52**: 195-201; discussion 201.

Arnold M, Karim-Kos HE, Coebergh JW, Byrnes G, Antilla A, Ferlay J et al. Recent trends in incidence of five common cancers in 26 European countries since 1988: Analysis of the European Cancer Observatory. *Eur J Cancer.* 2015; **51**: 1164-1187.

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**: 1045-1054.

Benchikh A, Savage C, Cronin A, Salama G, Villers A, Lilja H et al. 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.

Benson MC, Whang IS, Olsson CA, McMahon DJ and Cooner WH. The use of prostate specific antigen density to enhance the predictive value of intermediate levels of serum prostate specific antigen. *J Urol.* 1992; **147**: 817-821.

Bertaglia V, Tucci M, Fiori C, Aroasio E, Poggio M, Buttigliero C et al. Effects of serum testosterone levels after 6 months of androgen deprivation therapy on the outcome of patients with prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 2013; **11**: 325-330.e1.

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

Brawer MK, Chetner MP, Beatie J, Buchner DM, Vessella RL and Lange PH. Screening for prostatic carcinoma with prostate specific antigen. *J Urol.* 1992; **147**: 841-845.

Brawley OW and Kramer BS. Cancer screening in theory and in practice. *J Clin Oncol.* 2005; **23**: 293-300.

Brock M, von Bodman C, Sommerer F, Löppenber B, Klein T, Deix T et al. Comparison of real-time elastography with grey-scale ultrasonography for detection of organ-confined prostate cancer and extra capsular extension: a prospective analysis using whole mount sections after radical prostatectomy. *BJU Int.* 2011; **108**: E217-22.

Bryant RJ, Sjöberg DD, Vickers AJ, Robinson MC, Kumar R, Marsden L et al. Predicting high-grade cancer at ten-core prostate biopsy using four kallikrein markers measured in blood in the ProtecT study. *J Natl Cancer Inst.* 2015; **107**: 1-6

Carroll P, Coley C, McLeod D, Schellhammer P, Sweat G, Wasson J et al. Prostate-specific antigen best practice policy--part I: early detection and diagnosis of prostate cancer. *Urology.* 2001; **57**: 217-224.

Carter HB, Albertsen PC, Barry MJ, Etzioni R, Freedland SJ, Greene KL et al. Early detection of prostate cancer: AUA Guideline. *J Urol.* 2013; **190**: 419-426.

Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, Brant LJ, Chan DW, Andres R et al. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA.* 1992; **267**: 2215-2220.

Catalona WJ, Richie JP, deKernion JB, Ahmann FR, Ratliff TL, Dalkin BL et al. 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**: 2031-2036.

Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL and Basler JW. Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening. *JAMA.* 1993; **270**: 948-954.

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJ et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med.* 1991; **324**: 1156-1161.

Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL, Wang TJ, Rittenhouse HG, Ratliff TL et al. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. *JAMA.* 1995; **274**: 1214-1220.

Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol.* 2012; **61**: 1079-1092.

Chen YT, Luderer AA, Thiel RP, Carlson G, Cuny CL and Soriano TF. Using proportions of free to total prostate-specific antigen, age, and total prostate-specific antigen to predict the probability of prostate cancer. *Urology.* 1996; **47**: 518-524.

Chodak GW, Keller P and Schoenberg HW. Assessment of screening for prostate cancer using the digital rectal examination. *J Urol.* 1989; **141**: 1136-1138.

Christensson A, Laurell CB and Lilja H. Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *Eur J Biochem.* 1990; **194**: 755-763.

Chybowski FM, Bergstralh EJ and Oesterling JE. The effect of digital rectal examination on the serum prostate specific antigen concentration: results of a randomized study. *J Urol.* 1992; **148**: 83-86.

Cole P and Morrison AS. Basic issues in population screening for cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1980; **64**: 1263-1272.

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

Cózar JM, Miñana B, Gómez-Veiga F, Rodríguez-Antolín A, Villavicencio H, Cantalapiedra A et al. [National prostate cancer registry 2010 in Spain]. *Actas Urol Esp.* 2013; **37**: 12-19.

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

Dalkin BL, Ahmann FR and Kopp JB. Prostate specific antigen levels in men older than 50 years without clinical evidence of prostatic carcinoma. *J Urol.* 1993; **150**: 1837-1839.

Dason S, Allard CB, Tong J and Shayegan B. Defining a new testosterone threshold for medical castration: Results from a prospective cohort series. *Can Urol Assoc J.* 2013; **7**: E263-7.

de la Taille A, Irani J, Graefen M, Chun F, de Reijke T, Kil P et al. Clinical evaluation of the PCA3 assay in guiding initial biopsy decisions. *J Urol.* 2011; **185**: 2119-2125.

DeAntoni EP. Age-specific reference ranges for PSA in the detection of prostate cancer. *Oncology (Williston Park).* 1997; **11**: 475-82, 485; discussion 485.

El-Shater Bosaily A, Parker C, Brown LC, Gabe R, Hindley RG, Kaplan R et al. PROMIS-- Prostate MR imaging study: A paired validating cohort study evaluating the role of multi-parametric MRI in men with clinical suspicion of prostate cancer. *Contemp Clin Trials.* 2015; **42**: 26-40.

Elgamal AA, Cornillie FJ, Van Poppel HP, Van de Voorde WM, McCabe R and Baert LV. Free-to-total prostate specific antigen ratio as a single test for detection of significant stage T1c prostate cancer. *J Urol.* 1996; **156**: 1042-7; discussion 1047.

Epstein JI. 2002. Pathology of Prostatic Neoplasia. In *Campbell's Urology.* (ed. PC W), pp. Philadelphia: Saunders.

España F, Martínez M, Royo M, Estellés A, Alapont JM, Navarro S et al. Changes in molecular forms of prostate-specific antigen during treatment with finasteride. *BJU Int.* 2002; **90**: 672-677.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015; **136**: E359-86.

Garcia-Cruz E, Huguet J, Piqueras M, Marquez MP, Peri L, Izquierdo L et al. Low testosterone bioavailability is related to prostate cancer diagnose in patients submitted to prostate biopsy. *World J Urol.* 2012; **30**: 361-365.

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

Goode RR, Marshall SJ, Duff M, Chevli E and Chevli KK. Use of PCA3 in detecting prostate cancer in initial and repeat prostate biopsy patients. *Prostate*. 2013; **73**: 48-53.

Grosman H, Fabre B, Mesch V, Lopez MA, Schreier L, Mazza O et al. Lipoproteins, sex hormones and inflammatory markers in association with prostate cancer. *Aging Male*. 2010; **13**: 87-92.

Guess HA, Heyse JF and Gormley GJ. The effect of finasteride on prostate-specific antigen in men with benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 1993; **22**: 31-37.

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.

Haffner J, Lemaitre L, Puech P, Haber GP, Leroy X, Jones JS et al. Role of magnetic resonance imaging before initial biopsy: comparison of magnetic resonance imaging-targeted and systematic biopsy for significant prostate cancer detection. *BJU Int*. 2011; **108**: E171-8.

Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol*. 2014a; **65**: 467-479.

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*. 2014b; **65**: 124-137.

Hemminki K. Familial risk and familial survival in prostate cancer. *World J Urol*. 2012; **30**: 143-148.

Hodge KK, McNeal JE, Terris MK and Stamey TA. Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate. *J Urol*. 1989; **142**: 71-4; discussion 74.

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

Hori S, Blanchet JS and 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. *BJU Int.* 2013; **112**: 717-728.

Hu R, Denmeade SR and Luo J. Molecular processes leading to aberrant androgen receptor signaling and castration resistance in prostate cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2010; **5**: 753-764.

Hudson MA, Bahnson RR and Catalona WJ. Clinical use of prostate specific antigen in patients with prostate cancer. *J Urol.* 1989; **142**: 1011-1017.

Huggins C and Hodges CV. Studies on prostatic cancer I. The effect of castration, of estrogen, and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate, *Cancer Res*, 1941; **1**:293–297.

Hugosson J, Carlsson S, Aus G, Bergdahl S, Khatami A, Lodding P et al. Mortality results from the Göteborg randomised population-based prostate-cancer screening trial. *Lancet Oncol.* 2010; **11**: 725-732.

Hyde Z, Flicker L, McCaul KA, Almeida OP, Hankey GJ, Chubb SA et al. Associations between testosterone levels and incident prostate, lung, and colorectal cancer. A population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012; **21**: 1319-1329.

Ilic D, Neuberger MM, Djulbegovic M and Dahm P. Screening for prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; **1**: CD004720.

Jansson KF, Akre O, Garmo H, Bill-Axelsson A, Adolfsson J, Stattin P et al. Concordance of tumor differentiation among brothers with prostate cancer. *Eur Urol.* 2012; **62**: 656-661.

Kaaks R, Lukanova A, Rinaldi S, Biessy C, Soderberg S, Olsson T et al. Interrelationships between plasma testosterone, SHBG, IGF-I, insulin and leptin in prostate cancer cases and controls. *Eur J Cancer Prev.* 2003; **12**: 309-315.

Kamada S, Sakamoto S, Ando K, Muroi A, Fuse M, Kawamura K et al. Nadir Testosterone after Long-Term Followup Predicts Prognosis in Patients with Prostate Cancer Treated with Combined Androgen Blockade. *J Urol.* 2015;

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

Kawakami J, Siemens DR and Nickel JC. Prostatitis and prostate cancer: implications for prostate cancer screening. *Urology*. 2004; **64**: 1075-1080.

King CR, McNeal JE, Gill H and Presti JC. Extended prostate biopsy scheme improves reliability of Gleason grading: implications for radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004; **59**: 386-391.

Kirkham AP, Emberton M and Allen C. How good is MRI at detecting and characterising cancer within the prostate. *Eur Urol*. 2006; **50**: 1163-74; discussion 1175.

Klotz L, O'Callaghan C, Ding K, Toren P, Dearnaley D, Higano CS et al. Nadir testosterone within first year of androgen-deprivation therapy (ADT) predicts for time to castration-resistant progression: a secondary analysis of the PR-7 trial of intermittent versus continuous ADT. *J Clin Oncol*. 2015; **33**: 1151-1156.

Konety B, Zappala SM, Parekh DJ, Osterhout D, Schock J, Chudler RM et al. The 4Kscore® Test Reduces Prostate Biopsy Rates in Community and Academic Urology Practices. *Rev Urol*. 2015; **17**: 231-240.

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**: 986-994.

Lee F, Siders DB, Torp-Pedersen ST, Kirscht JL, McHugh TA and Mitchell AE. Prostate cancer: transrectal ultrasound and pathology comparison. A preliminary study of outer gland (peripheral and central zones) and inner gland (transition zone) cancer. *Cancer*. 1991; **67**: 1132-1142.

Lilja H, Christensson A, Dahlén U, Matikainen MT, Nilsson O, Pettersson K et al. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clin Chem*. 1991; **37**: 1618-1625.

Lin K CJM, Koenig H, Lam C, Maltz A. Prostate-Specific Antigen-Based Screening for Prostate Cancer: An Evidence Update for the U.S. Preventive Services Task Force. Evidence Synthesis. No. 90. *AHRQ Publication No. 12-05160-EF-1*. 2011;

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

Luderer AA, Chen YT, Soriano TF, Kramp WJ, Carlson G, Cuny C et al. Measurement of the proportion of free to total prostate-specific antigen improves diagnostic performance of prostate-specific antigen in the diagnostic gray zone of total prostate-specific antigen. *Urology*. 1995; **46**: 187-194.

Matsumoto AM and Bremner WJ. Serum testosterone assays--accuracy matters. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; **89**: 520-524.

Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev*. 1989; **10**: 232-274.

Mettlin C, Lee F, Drago J and Murphy GP. The American Cancer Society National Prostate Cancer Detection Project. Findings on the detection of early prostate cancer in 2425 men. *Cancer*. 1991; **67**: 2949-2958.

Moore CM, Robertson NL, Arsanious N, Middleton T, Villers A, Klotz L et al. Image-guided prostate biopsy using magnetic resonance imaging-derived targets: a systematic review. *Eur Urol*. 2013; **63**: 125-140.

Morgentaler A. Testosterone and prostate cancer: an historical perspective on a modern myth. *Eur Urol*. 2006; **50**: 935-939.

Morgentaler A. Testosterone deficiency and prostate cancer: emerging recognition of an important and troubling relationship. *Eur Urol*. 2007; **52**: 623-625.

Morote J, Orsola A, Planas J, Trilla E, Raventos CX, Cecchini L et al. Redefining clinically significant castration levels in patients with prostate cancer receiving continuous androgen deprivation therapy. *J Urol*. 2007; **178**: 1290-1295.

Morote J, Trilla E, Esquena S, Serrallach F, Abascal JM, Muñoz A et al. The percentage of free prostatic-specific antigen is also useful in men with normal digital rectal examination and serum prostatic-specific antigen between 10.1 and 20 ng/ml. *Eur Urol*. 2002; **42**: 333-337.

Moyer VA and U.S. PSTF. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*. 2012; **157**: 120-134.

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

Oefelein MG, Feng A, Scolieri MJ, Ricchiutti D and Resnick MI. Reassessment of the definition of castrate levels of testosterone: implications for clinical decision making. *Urology*. 2000; **56**: 1021-1024.

Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA et al. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA*. 1993; **270**: 860-864.

Oesterling JE, Jacobsen SJ, Klee GG, Pettersson K, Piironen T, Abrahamsson PA et al. Free, complexed and total serum prostate specific antigen: the establishment of appropriate reference ranges for their concentrations and ratios. *J Urol*. 1995; **154**: 1090-1095.

Parekh DJ, Punnen S, Sjoberg DD, Asroff SW, Bailen JL, Cochran JS et al. A multi-institutional prospective trial in the USA confirms that the 4Kscore accurately identifies men with high-grade prostate cancer. *Eur Urol*. 2015; **68**: 464-470.

Partin AW RR. 2016. Molecular biology, endocrinology and prostate physiology. In *Campbell's urology*. (ed. PC W), pp. Philadelphia: Saunders

Partin AW, Carter HB, Chan DW, Epstein JI, Oesterling JE, Rock RC et al. Prostate specific antigen in the staging of localized prostate cancer: influence of tumor differentiation, tumor volume and benign hyperplasia. *J Urol*. 1990; **143**: 747-752.

Partin AW, Catalona WJ, Southwick PC, Subong EN, Gasior GH and Chan DW. Analysis of percent free prostate-specific antigen (PSA) for prostate cancer detection: influence of total PSA, prostate volume, and age. *Urology*. 1996; **48**: 55-61.

Partin AW, Yoo J, Carter HB, Pearson JD, Chan DW, Epstein JI et al. The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J Urol*. 1993; **150**: 110-114.

Perachino M, Cavalli V and Bravi F. Testosterone levels in patients with metastatic prostate cancer treated with luteinizing hormone-releasing hormone therapy: prognostic significance? *BJU Int*. 2010; **105**: 648-651.

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

Perdonà S, Bruzzese D, Ferro M, Autorino R, Marino A, Mazzeola C et al. Prostate health index (phi) and prostate cancer antigen 3 (PCA3) significantly improve diagnostic accuracy in patients undergoing prostate biopsy. *Prostate*. 2013; **73**: 227-235.

Pickles T, Hamm J, Morris WJ, Schreiber WE and Tyldesley S. Incomplete testosterone suppression with luteinizing hormone-releasing hormone agonists: does it happen and does it matter? *BJU Int*. 2012; **110**: E500-7.

Puech P, Potiron E, Lemaitre L, Leroy X, Haber GP, Crouzet S et al. Dynamic contrast-enhanced-magnetic resonance imaging evaluation of intraprostatic prostate cancer: correlation with radical prostatectomy specimens. *Urology*. 2009; **74**: 1094-1099.

Qaseem A, Barry MJ, Denberg TD, Owens DK, Shekelle P and Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. Screening for prostate cancer: a guidance statement from the Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. *Ann Intern Med*. 2013; **158**: 761-769.

Raaijmakers R, Wildhagen MF, Ito K, Pàez A, de Vries SH, Roobol MJ et al. Prostate-specific antigen change in the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer, section Rotterdam. *Urology*. 2004; **63**: 316-320.

Reis LO. Variations of serum testosterone levels in prostate cancer patients under LH-releasing hormone therapy: an open question. *Endocr Relat Cancer*. 2012; **19**: R93-8.

Ries L EM, Kosary C, Hankey B, Miller B, Clegg L, et al. SEER Cancer Statistics Review. 2002; 1973-1999.

Roddam AW, Allen NE, Appleby P, Key TJ. Endogenous sex hormones and prostate cancer: A collaborative analysis of 18 prospective studies. *J Natl Cancer Inst*. 2008; **100**: 170-183.

Roehrborn CG, Marks LS, Fenter T, Freedman S, Tuttle J, Gittleman M et al. Efficacy and safety of dutasteride in the four-year treatment of men with benign prostatic hyperplasia. *Urology*. 2004; **63**: 709-715.

Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; **92**: 405-413.

Rove KO, Crawford ED, Perachino M, Morote J, Klotz L, Lange PH et al. Maximal Testosterone Suppression in Prostate Cancer-Free vs Total Testosterone. *Urology.* 2014; **83**: 1217-1222.

Rove KO, Debruyne FM, Djavan B, Gomella LG, Koul HK, Lucia MS et al. Role of testosterone in managing advanced prostate cancer. *Urology.* 2012; **80**: 754-762.

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.

Sakr WA, Grignon DJ, Crissman JD, Heilbrun LK, Cassin BJ, Pontes JJ et al. High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo.* 1994; **8**: 439-443.

Salonia A, Abdollah F, Capitanio U, Suardi N, Briganti A, Gallina A et al. Serum sex steroids depict a nonlinear u-shaped association with high-risk prostate cancer at radical prostatectomy. *Clin Cancer Res.* 2012; **18**: 3648-3657.

Salonia A, Gallina A, Briganti A, Abdollah F, Suardi N, Capitanio U et al. Preoperative hypogonadism is not an independent predictor of high-risk disease in patients undergoing radical prostatectomy. *Cancer.* 2011; **117**: 3953-3962.

Sawada N, Iwasaki M, Inoue M, Sasazuki S, Yamaji T, Shimazu T et al. Plasma testosterone and sex hormone-binding globulin concentrations and the risk of prostate cancer among Japanese men: a nested case-control study. *Cancer Sci.* 2010; **101**: 2652-2657.

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**: 1320-1328.

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

Schröder FH, van der Crujisen-Koeter I, de Koning HJ, Vis AN, Hoedemaeker RF and Kranse R. Prostate cancer detection at low prostate specific antigen. *J Urol.* 2000; **163**: 806-812.

Schulman CC, Irani J, Morote J, Schalken JA, Montorsi F, Chlosta PL et al. Testosterone measurement in patients with prostate cancer. *Eur Urol.* 2010; **58**: 65-74.

Shea JL, Wongt PY and Chen Y. Free testosterone: clinical utility and important analytical aspects of measurement. *Adv Clin Chem.* 2014; **63**: 59-84.

Siegel RL, Miller KD and Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015; **65**: 5-29.

Smith RA, von Eschenbach AC, Wender R, Levin B, Byers T, Rothenberger D et al. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer: update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancers. Also: update 2001--testing for early lung cancer detection. *CA Cancer J Clin.* 2001; **51**: 38-75; quiz 77.

Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS and Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med.* 1987; **317**: 909-916.

Tchetgen MB and Oesterling JE. The effect of prostatitis, urinary retention, ejaculation, and ambulation on the serum prostate-specific antigen concentration. *Urol Clin North Am.* 1997; **24**: 283-291.

Tchetgen MB, Song JT, Strawderman M, Jacobsen SJ and Oesterling JE. Ejaculation increases the serum prostate-specific antigen concentration. *Urology.* 1996; **47**: 511-516.

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**: 529-534.

Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Miller GJ, Ford LG et al. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N Engl J Med.* 2003; **349**: 215-224.

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med.* 2004; **350**: 2239-2246.

Tomlins SA. Urine PCA3 and TMPRSS2:ERG using cancer-specific markers to detect cancer. *Eur Urol.* 2014; **65**: 543-545.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; **65**: 87-108.

Vermeulen A, Verdonck L and Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; **84**: 3666-3672.

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.* 2010a; **28**: 2493-2498.

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.

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.* 2010b; **116**: 2612-2620.

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.* 2010c; **16**: 3232-3239.

Walsh PC. 2008 Whitmore Lecture: Radical prostatectomy--where we were and where we are going. *Urol Oncol.* 2009; **27**: 246-250.

Valor de la testosterona libre en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

Walz J, Marcy M, Pianna JT, Brunelle S, Gravis G, Salem N et al. Identification of the prostate cancer index lesion by real-time elastography: considerations for focal therapy of prostate cancer. *World J Urol.* 2011; **29**: 589-594.

Wein AJK, LR; Novick, AC; Partin, AW and Peters CA. Campbell-Walsh Urology. 2016; Wiren S, Stocks T, Rinaldi S, Hallmans G, Bergh A, Stenman UH et al. Androgens and prostate cancer risk: a prospective study. *Prostate.* 2007; **67**: 1230-1237.

Wolf AM, Wender RC, Etzioni RB, Thompson IM, D'Amico AV, Volk RJ et al. American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer: update 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010; **60**: 70-98.

Woodrum DL, Brawer MK, Partin AW, Catalona WJ and Southwick PC. Interpretation of free prostate specific antigen clinical research studies for the detection of prostate cancer. *J Urol.* 1998; **159**: 5-12.

Yasuda Y, Fujii Y, Yuasa T, Yamamoto S, Yonese J and Fukui I. Do testosterone levels have prognostic significance in patients with metastatic prostate cancer treated with combined androgen blockade. *Int J Urol.* 2015; **22**: 132-133.

Zhu Y, Chen Y, Qi T, Jiang J, Qi J, Yu Y et al. Prostate cancer detection with real-time elastography using a bi-plane transducer: comparison with step section radical prostatectomy pathology. *World J Urol.* 2014; **32**: 329-333.