

VALOR PRONÓSTICO DE LA PLOIDÍA DEL ADN EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

J.M. MARTÍNEZ JABALOYAS*, J.L. RUIZ CERDÁ*, S. SANZ CHINESTA*,
A. JIMÉNEZ**, M. HERNÁNDEZ**, J.F. JIMÉNEZ CRUZ*

*Servicio de Urología. **Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario La Fe. Valencia.

PALABRAS CLAVE:

Cáncer de próstata. Citometría de flujo. Ploidía del ADN. Pronóstico.

KEY WORDS:

Prostatic neoplasms. Flow cytometry. Ploidies. Prognosis.

Actas Urol Esp. 25 (4): 283-290, 2001

RESUMEN

OBJETIVO: Conocer la capacidad pronóstica de la ploidía del ácido desoxirribonucleico (ADN) en un grupo de pacientes afectos de cáncer de próstata, tratados con bloqueo androgénico.

MATERIAL Y MÉTODO: Realizamos un estudio retrospectivo en el que se incluyeron 136 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma prostático, y que fueron sometidos a tratamiento de supresión androgénica. Se evaluó la influencia que tenían en el pronóstico la edad, la categoría T y M, la puntuación de Gleason y la ploidía del ADN determinada mediante citometría de flujo, para lo que se realizaron análisis de supervivencia univariantes mediante el método de Kaplan-Meier y multivariante, utilizando el modelo de riesgos proporcionales de Cox.

RESULTADOS: En el análisis univariante, la categoría T y M, la puntuación de Gleason, y la ploidía del ADN mostraron valor pronóstico. El análisis de regresión de Cox seleccionó como variables con capacidad pronóstica la ploidía del ADN, la presencia de metástasis y la puntuación de Gleason.

CONCLUSIONES: La ploidía del ADN tiene valor pronóstico independiente en el cáncer de próstata tratado mediante bloqueo androgénico, y mejora la capacidad predictiva de los factores pronósticos clásicos.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To assess the prognostic value of deoxyribonucleic acid (DNA) ploidy in a group of patients with prostate cancer treated with androgenic blockade.

MATERIALS AND METHODS: A retrospective study on 136 patients with prostatic cancer having undergone androgenic blockade was carried out. The prognostic influence of age, T and M categories, Gleason score and flow cytometry-determined DNA ploidy from survival analyses. Univariate survival analysis was carried out following Kaplan-Meier's method, while for multivariate survival analysis Cox's proportional hazard model was used.

RESULTS: The univariate analysis showed that T and M categories, Gleason score and DNA ploidy have prognostic value. The Cox's regression analysis identified DNA ploidy, metastasis and Gleason score as independent variables having prognostic potential.

CONCLUSIONS: DNA ploidy has independent prognostic value in prostate cancer treated with androgenic blockade and improves the predictive potential of classical prognostic factors.

La incidencia del cáncer de próstata está aumentando a un ritmo constante. En la actualidad es el segundo cáncer más frecuente en la mayoría de países occidentales y ha pasado a ser el primero en los EE.UU y Escandinavia¹. Posee una serie de peculiaridades biológicas que lo diferencian de la mayoría de tumores: es un tumor de crecimiento lento y que aparece en edades avanzadas, de forma que, con frecuencia, la muerte sobreviene antes por patologías concomitantes que por la propia neoplasia. Además, existe un número considerable de tumores prostáticos que, presentes histológicamente, no tendrán manifestaciones clínicas. Es por ello que se hace necesario la búsqueda de factores pronósticos que nos permitan distinguir entre el carcinoma latente y aquel que progresará a la enfermedad clínica. También es necesario conocer la evolución de la enfermedad clínicamente manifiesta para planificar adecuadamente la estrategia terapéutica. La ploidía del ácido desoxirribonucleico (ADN) es un factor pronóstico recientemente introducido en la mayoría de tumores, entre ellos el carcinoma de próstata y aunque su utilidad no está bien definida, parece tener valor predictivo independiente sobre la evolución de la enfermedad^{2,3}. Sin embargo, existen autores que defienden la supremacía del grado histológico sobre los demás factores pronósticos⁴.

Intentamos establecer la utilidad del estudio de la ploidía del ADN mediante citometría de flujo como factor pronóstico independiente en un grupo de pacientes con cáncer de próstata sometidos a tratamiento hormonal.

MATERIAL Y MÉTODO

Características de los pacientes: Realizamos un estudio retrospectivo para el que se utilizaron 136 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de próstata en el Hospital Universitario La Fe en el período comprendido entre 1975 y 1988 que reunían una serie de criterios: que no se tratara de ninguna variante histológica que pudiera influir en el pronóstico, que los pacientes no hubieran sido sometidos a tratamiento con fines curativos ni hubieran recibido tratamientos previos que pudieran alterar las características del material a analizar, que se les hubiera realizado estudio de extensión, y que el seguimiento fuera mayor de 10 años.

La información del estadio se obtuvo a partir de las exploraciones clínicas y complementarias practicadas: ecografía transrectal y abdominal, Rx tórax, TAC abdominopélvico y rastreo óseo. Se ha utilizado la clasificación TNM de 1997⁵ y se agrupó a los pacientes según las categorías T y M, sin distinguir entre pacientes M1a y M1b y excluyendo los pacientes con metástasis viscerales. No se valoró la categoría N para la clasificación clínica, de forma que no se distinguió entre pacientes N0 y N1. No incluimos PSA ya que en el momento del diagnóstico, los pacientes incluidos carecían de esa determinación.

Estudio anatomopatológico: Del archivo de anatomía patológica se obtuvieron las laminillas de cada caso, seleccionando las de mayor contenido tumoral y mayor indiferenciación. Las muestras analizadas correspondieron a resecciones transuretrales de próstata en 100 casos (73,5%), adenomectomía transcapsular o transvesical en 18 (13,2%), biopsia transperineal en 13 (9,6%) y biopsia transrectal en 5 (3,7%). Se escogieron los bloques de parafina correspondientes a las laminillas previamente seleccionadas y a cada bloque se le practicaron 5 cortes: uno inicial de 5 µm, 3 de 50 µm y finalmente otro de 5 µm. Los cortes de 5 µm se tiñeron con hematoxilina eosina y se confirmó la existencia de células tumorales en ambos. En el primer corte se estudió el grado histológico utilizando la puntuación de Gleason, lo que realizó un único patólogo. Para el análisis estadístico agrupamos el grado histológico en bien diferenciado (grado 1-4 de Gleason) moderadamente diferenciado (5 a 7) y mal diferenciado (8-10).

Análisis de ADN: Las secciones de 50 µm se utilizaron para analizar el contenido de ADN mediante citometría de flujo. La preparación de las suspensiones nucleares a partir de las muestras parafinadas se realizó utilizando la técnica descrita por Hedley⁶. Una vez desparafinado el tejido se obtuvieron las células mediante digestión química, para lo que se utilizó 1,5 ml de pepsina al 0,5% en suero fisiológico ajustado a un pH de 1,5 con ácido clorhídrico N. Se incubó durante 1 hora a 37°C agitando suavemente con el agitador automático cada 10 minutos. Finalizado este proceso, se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 minutos. Se retiró la pepsina y se añade a cada tubo tampón fosfato, filtrando la suspensión pasándola por un fil-

tro de Nyal de 35 μ m con el fin de retirar los agregados celulares y restos fibrilares de tejido. Se procede al conteo de núcleos mediante un contador celular, asegurando una muestra con un contenido entre 1-2 millones de células/ml. Para la tinción específica con yoduro de propidio el sedimento nuclear obtenido fue procesado mediante el kit comercial: DNA-Prep (Coulter Reagents Kit) que está compuesto de 2 preparaciones: *DNA-Prep LPR*, y *DNA Prep Stain*. Este sistema dispensa inicialmente 100 microlitros de un reactivo de lisis y permeabilización (DNA-Prep LPR), compuesto por un detergente no iónico y un agente fijador. Los núcleos estabilizados se tiñen a continuación con la solución de yoduro de propidio (0,05 mg/ml) en presencia de ribonucleasa A (DNA-Prep Stain).

El material procesado fue adquirido y analizado mediante un citómetro de flujo Cytoronabsolute (Ortho Diagnostic Systems Inc.) equipado con un láser de argón que opera a 15 W. La fluorescencia del yoduro de propidio se excita a 488 nm y emite a 560-580 nm. Se ha utilizado como control el pico diploide de linfocitos de sangre periférica. Para la adquisición de la muestra se empleó el programa Immunocount II, versión 2.0 (ORTHO Diagnostic System Inc.). Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa Verity: Modifit 5.2 (Verity Software house Inc.).

Del análisis de los histogramas se estudiaron los siguientes parámetros: coeficiente de variación, índice de ADN, porcentaje de células en cada fase del ciclo celular, que nos proporciona el índice de proliferación y el % de células aneuploides.

Sólo se han aceptado aquellos histogramas con un coeficiente de variación inferior a 10. Consideramos: ADN diploides a los histogramas con un solo pico G0G1 e índice de ADN igual a 1; ADN aneuploide hiperdiploide a los histogramas con más de un pico G0G1 sobre la fase S e índice de ADN mayor a 1,05 tomando como diploide el primer pico, comprobado con los controles diploides, aneuploide hipodiploide a los histogramas con más de un pico G0G1 e índice de ADN menor a 0,95, tomando como diploide el segundo pico, comprobado con los controles diploides, aneuploide tetraploide cuando el segundo pico se encuentra sobrepuesto a la fase G2-M y el índice de ADN se encuentra entre 1,9 y 2,1 siempre que supere el 15% del total de células.

Estudio estadístico: Para analizar la asociación de la ploidía del ADN con el estadio y grado tumoral realizamos el test de la Chi-cuadrado.

El análisis de supervivencia se realizó mediante el método de Kaplan y Meier y para la comparación de 2 o más grupos de pacientes se utilizó el test de Log-rank, calculando el riesgo relativo de cada uno de los grupos. Como técnica de análisis multivariante se utilizó el método de regresión múltiple de Cox. Como variables explicativas o predictivas se han considerado las características clínicas, anatomopatológicas y los parámetros derivados del estudio de contenido en ADN. Como variable respuesta se ha considerado el tiempo de supervivencia en meses.

RESULTADOS

La edad media de los pacientes fue de 70 ± 7 años (rango entre 49-89). El 75% de los tumores (103/136) eran extracapsulares (T3 o T4) y el 39,7% (54/136) habían desarrollado metástasis óseas en el momento del diagnóstico. En cuanto al estudio histológico, el 52,7% (72/136) eran moderadamente diferenciados (Tabla I), siguiéndoles en frecuencia los pobremente diferenciados (26,5%; 36/136).

De los 136 pacientes, 121 (89%) fueron tratados mediante supresión androgénica de inicio. Los 15 restantes (11%) se estableció pauta de seguimiento con tratamiento diferido. La mediana de supervivencia global fue de 49 meses y la probabilidad de sobrevivir a los 5 y 10 años del 46 y 28% respectivamente. En la Tabla I se muestra la distribución de los casos por edad, estadio y estudio histológico (puntuación de Gleason). En el análisis univariante la categoría T, la presencia de metástasis y el grado histológico tuvieron carácter pronóstico, de forma que los pacientes con tumores intraprostáticos (T1 y T2) presentaron una supervivencia significativamente mayor que los tumores extracapsulares (T3 y T4). A su vez, los pacientes portadores de tumores T4 tuvieron peores supervivencias que los de T3. La mediana de supervivencia fue de 77 meses para los pacientes que, en el momento del diagnóstico, estaban libres de metástasis frente a los 30 meses de los que presentaban enfermedad metastásica, mientras que la supervivencia disminuyó significativamente con la indiferenciación tumoral.

TABLA I

DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES POR ESTADIO, CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS Y RESULTADOS DEL ANÁLISIS UNIVARIANTE DE SUPERVIVENCIA

Variable	Número de casos (%)	Mediana de supervivencia en meses	Riesgo relativo Test de Cox	Valor de P Test de Log-Rank
Edad				
≤ 65	31 (22,8)	60	0,79	
66-75	69 (50,7)	49	1,03	0,30
> 75	36 (26,5)	43	1,19	
Categoría T				
T1	17 (12,5)	NA	0,33	
T2	16 (11,7)	78	0,55	< 0,001
T3	62 (45,6)	51	1,02	
T4	41 (30,2)	23	2,00	
Metástasis				
M0	82 (60,3)	77	0,72	< 0,001
M1	54 (39,7)	30	1,73	
Puntuación de Gleason				
Gleason 2-4	28 (20,6)	81	0,47	
Gleason 5-7	72 (52,9)	60	0,86	< 0,001
Gleason 8-10	36 (26,5)	21	2,70	

NA: La mediana de supervivencia no ha sido alcanzada.

En el 14% de las muestras (19/136), los estudios de citometría de flujo no fueron válidos, posiblemente por deterioro del material de biopsia. De los 117 válidos, 77 fueron diploides (65,8%), 31 aneuploides hiperdiploides (26,5%) y 9 aneuploides tetraploides (7,7%). Para el análisis de datos y debido a su escaso número, hemos asociado los tetraploides con los aneuploides, pues su comportamiento, aunque diferente, se aproxima más a estos últimos que a los diploides.

Estudiamos la asociación entre la ploidía del ADN con los parámetros clínicos e histológicos. Existe una asociación entre la puntuación de Gleason y la ploidía, de tal forma que entre los tumores más indiferenciados (Gleason 8-10) observamos mayor número de aneuploidías ($p < 0,001$). No encontramos relación entre la categoría T y M y la ploidía del ADN.

La supervivencia fue significativamente menor en los pacientes con tumores aneuploides que con

diploides con una mediana de supervivencia de 28 y 77 meses respectivamente (Tabla II y Figura 1). El índice de proliferación en los tumores diploides no tuvo carácter pronóstico, de forma que no se apreciaron diferencias en la supervivencia en relación a si fue mayor o menor, estableciendo el punto de corte en el valor de la media (17,4%).

Así, en el estudio univariante, las variables pronósticas fueron: la categoría T, la presencia de metástasis, la puntuación de Gleason y la ploidía del ADN.

En el estudio multivariante mostraron capacidad pronóstica independiente la ploidía del ADN, la puntuación de Gleason y la presencia de metástasis (Tabla III).

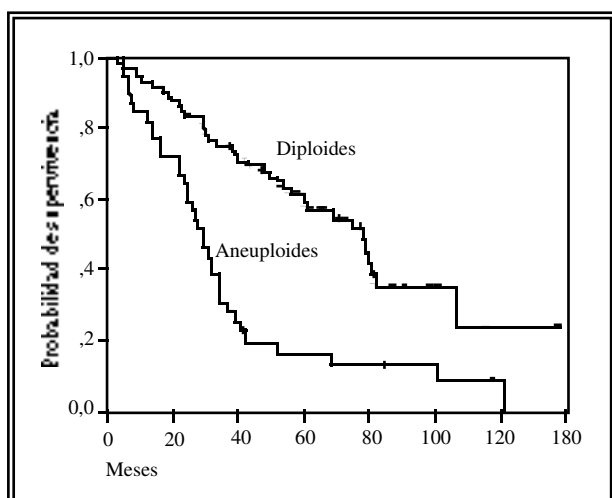
DISCUSIÓN

Al igual que en el resto de tumores, es interesante predecir el comportamiento individual de un carcinoma prostático para particularizar la pauta de tratamiento.

TABLA II

DISTRIBUCIÓN DE LOS TUMORES SEGÚN PLOIDÍA DEL ADN E ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN Y RESULTADO DEL ESTUDIO UNIVARIANTE DE SUPERVIVENCIA

Variable	Número de casos (%)	Mediana de supervivencia en meses	Riesgo relativo Test de Cox	Valor de P Test de Log-Rank
Contenido de ADN				
Diploide	77 (65,8)	77	0,68	<0,001
Aneuploide	40 (34,2)	28	1,65	
Índice de proliferación en tumores diploides				
< 17.4%	40 (51,9)	69	1	0,142
>17,4%	37 (48,1)	81	0,78	

**Figura 1. Curvas de supervivencia para los tumores diploides y los aneuploides.**

La edad, coincidiendo con otros autores⁷⁻¹⁰, no mostró influencia significativa en la supervivencia, aunque existen trabajos discordantes que le confieren valor pronóstico¹¹⁻¹³.

El estadio clínico (categoría T y metástasis) mostró valor pronóstico en el análisis univariante. Sin embargo la categoría T no fue seleccionada en el análisis multivariante, posiblemente por la elevada correlación de los estadios locales avanzados con los tumores indiferenciados. El problema del estadiaje clínico es el elevado índice de infraestadiaje local y regional. Las tasas de infraestadiaje local son superiores al 40%^{14,15}. A pesar de todas estas limitaciones la categoría T clínica continúa siendo útil como factor pronóstico².

El grado histológico sigue teniendo un valor pronóstico indiscutible. Además, es fácil de determinar por lo que continúa siendo el estándar comparativo en los estudios de factores pronósticos. Sin embargo, está lejos de ser el factor ideal, ya que tumores del mismo grado y estadio pueden comportarse de diferente forma. A ello se une la subjetividad en su identificación, la variabilidad intra e interobservador y la heterogeneidad tumoral. En el estudio multivariante el grado histológico aporta información pronóstica independiente, principalmente los tumores más indiferenciados (Gleason 8-10), que presentan un riesgo de mortalidad 3 veces superior (Tabla III).

Aunque la utilidad del ADN como factor pronóstico en el cáncer de próstata no está totalmente definido la primera publicación que establece una relación entre ploidía del ADN en el cáncer de próstata y el pronóstico data de 1966¹⁶. El principal problema a la hora de evaluar su utilidad está en que los estudios de contenido de ADN carecen de uniformidad metodológica, lo que explicaría en parte la gran variabilidad de resultados descritos. Para evaluar la capacidad pronóstica de la citometría de flujo realizamos estudios de supervivencia uni y multivariante. En ambos se demostró que el contenido de ADN aporta información pronóstica independiente sobre el comportamiento tumoral en pacientes sometidos a terapias paliativas, de forma que los tumores aneuploides tienen peor función de supervivencia que los diploides, con un incremento del riesgo relativo de mortalidad para los primeros. No todos los traba-

TABLA III

ANÁLISIS MULTIVARIANTE. MODELO DE REGRESIÓN OBTENIDO AL UTILIZAR COMO VARIABLES PREDICTIVAS LA EDAD, CATEGORÍA LOCAL T, PRESENCIA DE METÁSTASIS, GRADO HISTOLÓGICO DE GLEASON Y CONTENIDO EN ADN

Variable	Coefficiente B	Riesgo relativo	I.C. 95%	Significación
Aneuploidía	1,01	2,74	1,63-4,61	< 0,001
Puntuación de Gleason				< 0,001
Gleason 5-7	0,09	1,10	0,50-2,39	0,8128
Gleason 8-10	1,20	3,33	1,43-7,69	< 0,01
Metástasis	0,93	2,54	1,53-4,22	< 0,001

jos estudian la influencia de la ploidía en la supervivencia, pero la mayor parte de los que hacen este tipo de análisis informan del efecto negativo de las poblaciones aneuploides en el pronóstico¹⁷⁻³⁰.

Los tumores con contenido normal de ADN (diploides) muestran una buena y prolongada respuesta clínica al bloqueo androgénico. Tribukait²⁹, refiere que en los pacientes sometidos a terapia endocrina la ploidía, determinada mediante citometría de flujo, influye en el pronóstico, con diferencias significativas entre diploides, aneuploides y tetraploides. En el análisis multivariante que incluye edad, estadio local, metástasis, grado y ploidía, todas fueron significativas, aunque la ploidía fue la que más información pronóstica aportó, seguida de las metástasis²⁹.

Forsslund et al.²⁵, mediante citometría estática de imagen, describe que, en estadios locales T2 y T3, los tumores aneuploides hiperdiploides progresan rápidamente, con una mortalidad del 96% a los 5 años. Los tetraploides tienen un comportamiento intermedio. El estudio multivariante incluye edad, ploidía, grado, categoría T y metástasis. La ploidía aparece como un potente predictor de supervivencia. También se ha estudiado la influencia de la ploidía en tumores con estadio D2 sometidos a bloqueo androgénico²¹, observando que el contenido en ADN posee valor predictivo en términos de supervivencia y ofrece una potente información pronóstica cuando se asocia al grado. Di Silverio et al.²⁴, en un grupo de pacientes sometidos a bloqueo androgénico, encuentra correlación entre grado, estadio y ploidía, con menor supervivencia en los aneuploides. En los tumores grado 3 observa diferencia en la supervivencia entre diploides y aneuploides, no siendo así

en los grado 1. En una serie de tumores clínicamente localizados sometidos a seguimiento la aneuploidía no tiene una influencia negativa sobre la supervivencia³¹. Por el contrario, en el estudio multivariante, solo el grado histológico tiene valor pronóstico independiente y únicamente en los tumores de bajo grado se observa que la ploidía tuviera significación pronóstica.

El porcentaje de células en fase de síntesis refleja la actividad proliferativa del tumor³². En nuestra serie, los pacientes portadores de tumores diploides tuvieron supervivencias similares con independencia de que posean mayor o menor índice de proliferación. El significado del índice de proliferación en el cáncer de próstata no se ha establecido claramente, de forma que existen autores que no encuentran influencia en cuanto a la supervivencia^{28,31}, frente a otros que señalan que sí ofrece información sobre el comportamiento tumoral^{23,34,35}.

Como conclusión, la ploidía del ADN determinada mediante citometría de flujo ofrece información pronóstica independiente en pacientes con cáncer de próstata tratados con bloqueo androgénico, mejorando la capacidad predictiva de la puntuación de Gleason y del estadio clínico.

REFERENCIAS

1. BOYLE P, MAISONNEUVE P, NAPALKOV P: Geographical and temporal patterns of incidence and mortality from prostate cancer. *Urology* 1995; **46** (Suppl A): 47-55.
2. HUTTER RVP, MONTIE JE, BUSCH C, GRIGNON DJ, LIEBER M, LOGOTHETIS C, RAGDE H, REUTER VE: Current prognostic factors and their relevance to staging. *Cancer* 1996; **78**: 369-371.

3. LIEBER MM: Practical clinical utility of DNA ploidy for managing patients with prostate carcinoma. *Urology* 1995; **45**: 558-562.
4. STAMEY TA: DNA ploidy status. *Urology* 1995; **45**: 563-565.
5. SOBIN LH, WITTEKIND CH (eds): UICC: TNM Classification of Malignant Tumours, 5th edn. New York. Wiley-Liss, Inc. 1997.
6. HEDLEY WD, FRIEDLANDER ML, TAYLOR IW, RUGG CA, MUSGROVE EA: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; **31**: 1.333-1.335.
7. SOLOWAY MS: The importance of prognostic factors in advanced prostate cancer. *Cancer* 1990; **66**: 1.017-1.021.
8. MULDER PFA, DIJKMAN GA, FERNÁNDEZ DEL MORAL P, THEEUWES AGM, DEBRUYNE FML, Members of the Dutch Southeastern Urological Cooperative Group: Analysis of prognostic factors in disseminated prostatic cancer. *Cancer* 1990; **65**: 2.758-2.761.
9. ERNST DS, HANSON J, VENNER PM: Analysis of prognostic factors in men with metastatic prostate cancer. Uro-oncology Group of Northern Alberta. *J Urol* 1991; **146**: 372-376.
10. ARRIZABALAGA MORENO M, GARCÍA GONZÁLEZ JI, MORA DURVÁN M, DíEZ RODRÍGUEZ JM, ESTEBAN ARTIAGA R, NAVARRO SEBASTIÁN J, CASTRO PITA M, PANIAGUA ANDRÉS P: Evolución y factores pronósticos de los adenocarcinomas de próstata metastásicos al diagnóstico. *Actas Urol Esp* 1997; **21**: 724-736.
11. WILSON JM, KEMP IW, STEIN GJ: Cancer of the prostate. Do younger men have a poorer survival rate? *Br J Urol* 1984; **56**: 391-396.
12. GRÖNBERG H, DAMBER JE, JONSSON H, LENNER P: Patient age as a prognostic factor in prostate cancer. *J Urol* 1994; **152**: 892-895.
13. KRONGRAD A, LAI H, LAMM SH, LAI S: Mortality in prostate cancer. *J Urol* 1996; **156**: 1.084-1.091.
14. CATALONA WJ, BIGG S: Nerve-sparing radical prostatectomy: evaluation of results after 250 patients. *J Urol* 1990; **143**: 538.
15. LEANDRI P, ROSSIGNOL G, GAUTIER JR, RAMON J: Radical retropubic prostatectomy: morbidity and quality of life. Experience with 620 consecutive cases. *J Urol* 1992; **147**: 883-887.
16. TAVARES AS, COSTA J, DE CARVALHO A, REIS M: Tumor ploidy and prognosis in carcinomas of the bladder and prostate. *Brit J Cancer* 1966; **20**: 438-441.
17. FORDHAM MVP, BURDGET AH, MATTHEWS J, WILLIAMS G, COOKE T: Prostatic carcinoma cell DNA content measured by flow cytometry and its relation to clinical outcome. *Br J Surg* 1986; **73**: 400-403.
18. TRIBUKAIT B: Flow cytometry in assessing the clinical aggressiveness of genito-urinary neoplasms. *World J Urol* 1987; **5**: 108-122.
19. NATIV O, WINKLER HZ, RAZ Y, THERNEAU TM, FARROW GM, MYERS RP, ZINCKE H, LIEBER MM: Stage C prostatic adenocarcinoma: flow cytometric nuclear DNA ploidy analysis. *Mayo Clin Proc* 1989; **64**: 911-919.
20. MONTGOMERY BT, NATIV O, BLUTE ML, FARROW GM, MYERS RP, ZINCKE H, THERNEAU TM, LIEBER MM: Stage B prostate adenocarcinoma. Flow cytometric nuclear DNA ploidy. *Arch Surg* 1990; **125**: 327-331.
21. MILLER J, HORSFALL DJ, MARSHALL VR, RAO DM, LEONG SY: The prognostic value of deoxyribonucleic acid flow cytometric analysis in stage D2 prostatic carcinoma. *J Urol* 1991; **145**: 1.192-1.196.
22. NAGEL R, AL ABADI H: The prognostic significance of ploidy and DNA-heterogeneity in the primary diagnosis and monitoring of patients with locally advanced prostatic carcinoma. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1991; **138**: 83-92.
23. VISAKORPI T, KALLIONIEMI OP, PARONEN IY, ISOLA JJ, HEIKKINEN AI, KOIVULA TA: Flow cytometric analysis of DNA ploidy and S-phase fraction from prostatic carcinomas: implications for prognosis and response to endocrine therapy. *Br J Cancer* 1991; **64**: 578-582.
24. DI SILVERIO F, D'ERAMO G, CAPONERA M, PERSECHINO F, ELEUTERI P, CAVALLO D, DE VITA R, FORTE D: The prognostic value of DNA content in patients with prostatic carcinoma. *Eur Urol* 1992; **21 (suppl)**: 92-95.
25. FORSSLUND G, ESPOSTI P, NILSSON B, ZETTERBERG A: The prognostic significance of nuclear DNA content in prostatic carcinoma. *Cancer* 1992; **69**: 1.432-1.439.
26. SONG J, CHENG WS, CUPPS RE, EARLE JD, FARROW GM, LIEBER MM: Nuclear deoxyribonucleic acid content measured by static cytometry: important prognostic association for patients with clinically localized prostate carcinoma treated by external beam radiotherapy. *J Urol* 1992; **147**: 794-797.
27. ZINCKE H, BERGSTRALH EJ, LARSON-KELLER JJ, FARROW GM, MYERS RP, LIEBER MM, BARRETT DM, RIFE RP, GONCHOROFF NF: Stage D1 prostate cancer treated by radical prostatectomy and adjuvant hormonal treatment. Evidence for favorable survival in patients with DNA diploid Tumors. *Cancer* 1992; **70 (1 Suppl)**: 311-323.
28. TINARI N, NATOLI C, ANGELUCCI D, TENAGLIA R, FIORENTINO B, DI STEFANO P, AMATETTI C, ZEZZA A, NICOLAI M, IACOBELLI S: DNA and S-phase fraction analysis by flow cytometry in prostate cancer. Clinicopathologic implications. *Cancer* 1993; **71**: 1.289-1.296.
29. TRIBUKAIT B: Nuclear deoxyribonucleic acid determination in patients with prostate carcinomas: clinical research and application. *Eur Urol* 1993; **23 (suppl 2)**: 64-76.

30. POLLACK A, ZAGARS GK, EL NAGGAR AK, TERRY NH: Relationship of tumor DNA-ploidy to serum prostate-specific antigen doubling time after radiotherapy for prostate cancer. *Urology* 1994; **44**: 711-718.
 31. BORRE M, HOYER M, NERSTROM B, OVERGAARD J: DNA ploidy and survival of patients with clinically localized prostate cancer treated without intent to cure. *Prostate* 1998; **36**: 244-249.
 32. KOSS LG, CZERNIAK B, HERZ F, WERSTO RP: Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: a critical appraisal. *Hum Pathol* 1989; **20**: 528-548.
 33. ESKELINEN M, LIPPONEN P, MAJAPURO R, SYRJANEN K, NORDLING S: DNA ploidy, S phase fraction and G2 fraction as prognostic determinants in prostatic adenocarcinoma. *Eur Urol* 1991; **20**: 62-66.
 34. CENTENO BA, ZIETMAN AL, SHIPLEY WU, SOBCZAK ML, SHIPLEY JW, PREFFER FI, BOYLE BJ, COLVIN RB: Flow cytometric analysis of DNA ploidy, percent S-phase fraction, and total proliferative fraction as prognostic indicators of local control and survival following radiation therapy for prostate carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; **30**: 309-315.
 35. VESALAINEN S, NORDLING S, LIPPONEN P, TALJA M, SYRJANEN K: Progression and survival in prostatic adenocarcinoma a comparison of clinical stage, Gleason grade, S-phase fraction and DNA ploidy. *Br J Cancer* 1994; **70**: 309-314.
-

Dr. J.M. Martínez Jabaloyas
Camarena Plaza, 1 - pta. 13
46117 Betera (Valencia)

(Trabajo recibido el 28 Diciembre de 2000)