



**Universidad de Oviedo**

**Investigación en Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas**

**“Expresión diferencial y significación clínica de las proteínas relacionadas con la inflamación en la hiperplasia benigna prostática y en el cáncer de próstata”**

**Sandra Bermúdez Fernández**

**Junio 2014**

**Tesis Doctoral**





**Universidad de Oviedo**

**Investigación en Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas**

**“Expresión diferencial y significación clínica de las proteínas relacionadas con la inflamación en la hiperplasia benigna prostática y en el cáncer de próstata”**

**Autora**

**Director**

**Co-director/Tutor**

**Sandra Bermúdez Fernández**

**Dr. Francisco José Vizoso Piñeiro**

**Dr. Safwan Escaf Barmadh**





## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Expresión diferencial y significación clínica de las proteínas relacionadas con la inflamación en la hiperplasia benigna prostática y en el cáncer de próstata.	Inglés: Differential expression and clinical significance of the proteins associated with inflammation in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer.
2.- Autor	
Nombre: Sandra Bermúdez Fernández	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Investigación en Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas.	
Órgano responsable: Departamento de Medicina	

### RESUMEN (en español)

La notable prevalencia de la hiperplasia benigna prostática (HBP), así como la creciente incidencia del cáncer de próstata (CaP) a nivel mundial y su elevada prevalencia, han hecho que estas patologías sean consideradas como una comorbilidad más asociada a la edad. Sin embargo, el CaP constituye una enfermedad heterogénea que puede ir desde asintomática a una enfermedad maligna que evoluciona rápidamente hacia la muerte del paciente. Existe la hipótesis de que la inflamación crónica es un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer. En varios estudios epidemiológicos, el papel de la inflamación crónica en el proceso de carcinogénesis se examinó a través de estudios de las citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. De hecho, las células inflamatorias y los factores inmunomoduladores presentes en el microambiente tumoral influyen en la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis. Se ha considerado que el infiltrado leucocitario es un mecanismo de defensa intrínseca contra el desarrollo de los tumores, sin embargo, la infiltración de leucocitos tales como macrófagos y linfocitos-T y B, también puede influir en la promoción del cáncer a través de la secreción de citoquinas, factores de crecimiento, quimioquinas y proteasas, que estimulan la proliferación y la invasividad de las células cancerosas.

El objetivo de este estudio ha sido evaluar la expresión de factores relacionados con la inflamación en la HBP y en los carcinomas prostáticos, y su posible relación con las características clínico-patológicas de los pacientes, así como la posible relación con la recurrencia bioquímica (elevación de los niveles séricos de PSA) y la supervivencia.

Se realizó un estudio inmunohistoquímico utilizando microarrays de tejido y anticuerpos contra el interferón  $\beta$  (IFN $\beta$ ), el factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-10 e IL-17 en tejido hiperplásico y tumoral prostático. Se realizaron determinaciones en biopsias prostáticas procedentes de 50 pacientes con HBP y de 118 pacientes con carcinoma prostático primario (78 sin recurrencia y 40 con recurrencia durante el seguimiento periódico del estudio).

La inmunotinción para todas las proteínas del estudio ha sido localizada tanto en las células tumorales como en las células estromales en la mayoría de los tumores. Sin embargo la expresión global del IFN $\beta$  ha sido mayor en el tejido prostático hiperplásico, mientras que la expresión global de la IL-1 $\beta$  ha sido mayor en los carcinomas prostáticos. Los valores elevados de score para la IL-1 $\beta$ , así como los valores menores de score para el IFN $\beta$  han sido significativamente asociados con la recurrencia bioquímica. El análisis ha definido un valor de



score de 160 para la IL-1 $\beta$  y de 170 para el IFN $\beta$ , como el punto óptimo de corte que identifica a 37 pacientes (32,7%) y 30 pacientes (26,8%) respectivamente, con alta probabilidad de recurrencia bioquímica. Además, la combinación simultánea de ambos valores, identifica a un 10% de pacientes con alta probabilidad de recurrencia bioquímica ( $p= 0,004$ ). Adicionalmente, este estudio indica de forma reiterada el papel protector del IFN $\beta$ , puesto que en aquellos pacientes con estadio tumoral T2 o con grado Gleason 7-10 o en pacientes con localización tumoral bilateral, o incluso en pacientes con niveles elevados de PSA, la mayor expresión del IFN $\beta$  está relacionada con un mejor pronóstico. El análisis multivariante según el modelo de regresión de Cox, indica que el punto de corte de 170 para el IFN $\beta$  ( $p= 0,035$ ), es un factor independiente asociado con la recurrencia bioquímica en pacientes con cáncer de próstata.

Tanto la IL-1 $\beta$  como el IFN $\beta$  pueden ser nuevos biomarcadores para identificar a los pacientes con alto/bajo riesgo de cáncer de próstata, y para seleccionar la opción terapéutica más adecuada.

### RESUMEN (en Inglés)

Because of the remarkable prevalence of benign prostatic hyperplasia (BPH), and the increasing incidence of prostate cancer (CaP) worldwide and its high prevalence, these conditions could be considered a normal age related phenomenon. However, prostate cancer is a heterogeneous disease ranging from asymptomatic to a rapidly fatal systemic malignancy. There is a hypothesis suggesting that chronic inflammation is a risk factor for the development of cancer. In several epidemiological studies, the role of chronic inflammation in the process of carcinogenesis was examined through studies of the pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. In fact, inflammatory cells and immunomodulatory factors in the tumor microenvironment influence tumor progression and metastasis. It has been considered that tumor-infiltrating leukocytes were an intrinsic defense mechanism against developing tumors, however, infiltration of leukocyte such as macrophages, T-cells and B-cells, can also influence cancer promotion by secreting cytokines, growth factors, chemokines and proteases, which stimulate proliferation and invasiveness in cancer cells.

The aim of this study was to evaluate the expression of inflammatory-related factors in BPH and prostate carcinomas, and their possible relationship with the clinicopathologic characteristics of patients and their possible relationship with biochemical recurrence (elevation of PSA serum levels) and survival.

An immunohistochemical study was performed using tissue microarrays and specific antibodies against interferon  $\beta$  (IFN $\beta$ ), nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B), interleukin- 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-10 and IL-17 in prostatic hyperplastic and tumor tissue. Determinations in prostatic biopsies from 50 patients with BPH and cancer specimens from 118 patients with primary prostate cancer (78 without and 40 with recurrence during the follow-up period) were performed. Immunostaining for all the studied proteins was localized both in tumor cells and in stromal cells in the majority of tumors. However, the overall expression of IFN- $\beta$  was higher in the hyperplastic prostate tissue, while the overall expression of the IL-1 $\beta$  was higher in prostate carcinomas. High score values for IL-1 $\beta$  or low score values for IFN $\beta$  were significantly associated with biochemical recurrence. The analysis defined a score value of 160 for IL-1 $\beta$  and of 170 for IFN $\beta$ , as the optimal cut-off points which identified 37 patients (32,7%) and 30 patients (26,8%), respectively, having high probability of biochemical recurrence. Moreover, the simultaneous combination of both values, identifies 10% of patients with high probability of biochemical recurrence ( $p= 0,004$ ). Additionally, this study indicates the protective role of IFN $\beta$  since in patients with T2 tumor stages or with 7-10 Gleason score or in patients with bilateral



tumor location or even in patients with high PSA levels, increased expression of IFN $\beta$  is related with a better prognosis. Multivariate analysis according to a Cox model indicates that the cut-off point 170 for IFN $\beta$  ( $p= 0,035$ ), is an independent factor associated with biochemical recurrence in patients with prostate cancer.

Both IL-1 $\beta$  and IFN $\beta$  may be new biomarkers to distinguish high/low risk patients with prostate cancer, and to select appropriate therapeutic approaches.

**SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MEDICO-QUIRÚRGICAS**  
**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACION EN CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MEDICO QUIRURGICAS.**





*A mis padres, por haberme educado en la confianza y perseverancia.*

*A mi hermano, por recordarme siempre que si uno quiere, todo es posible.*

*A Jorge, por su paciencia y apoyo.*

## ABREVIATURAS

- **AA:** Antiandrógenos.
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- **AE:** Actitud expectante.
- **AJCC:** *American Joint Committee for cancer staging and end results reporting.*
- **ARN:** Ácido ribonucleico.
- **ASAP:** Proliferación microacinar atípica.
- **BAC:** Bloqueo androgénico completo.
- **CaP:** Cáncer de próstata.
- **COX-2:** Ciclooxygenasa 2.
- **CMH II:** Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II.
- **CPA:** Célula presentadora de antígeno.
- **DA:** Deprivación androgénica.
- **DHT:** Dihidrotestosterona.
- **EAE:** Encefalitis alérgica experimental
- **ENCR:** *European network of cancer registers.*
- **ERSPC:** *The European randomised study of screening for prostate cancer.*
- **ETR:** Ecografía transrectal.
- **FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos.
- **HBP:** Hiperplasia benigna prostática.
- **HLA:** Antígenos de leucocitos humanos.
- **ICE:** Enzima convertidora de IL-1 $\beta$ .
- **IFN:** Interferón.
- **IGF:** Factor de crecimiento.
- **IL:** Interleuquina.
- **JAK:** *Janus kinase.*
- **LHRH:** Hormona liberadora de gonadotropina.
- **MAPK:** *Mitogen-activated proteinkinase.*
- **MHC:** Mayor complejo de histocompatibilidad.
- **MICs:** Células mononucleares inflamatorias
- **NF $\kappa$ B:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras *kappa* de las células B activadas.
- **NK :** *Natural Killer.*
- **PI3K/Akt:** Phosphoinositide 3-kinase / Akt: Protein kinase B.
- **PIN:** Neoplasia intraepitelial prostática.
- **PKA:** *Protein kinase A.*
- **PR:** Prostatectomía radical.
- **PSA :** Antígeno específico prostático.
- **RA:** Receptor androgénico.
- **RMN:** Resonancia nuclear magnética.
- **RTE:** Radioterapia externa.
- **RTPU:** Resección transuretral prostática.
- **SEER:** *Surveillance epidemiology and end results.*
- **SELECT:** Informe inicial del selenio y la vitamina E para la prevención del cáncer de próstata.
- **STUI:** Síntomas del tracto urinario inferior.
- **SYP:** Sinaptofisina.
- **TAC:** Tomografía axial computerizada.
- **TLR:** Receptor de tipo *toll.*
- **TNF:** Factor de necrosis tumoral.
- **TR:** Tacto rectal.
- **TRAF:** Receptores TNF asociados al factor.
- **VA:** Vigilancia activa.

# Índice

<b>Agradecimientos</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	3
1. La Próstata.....	4
1.1. Situación y relaciones.....	4
1.2. Estructura .....	5
2. Hiperplasia benigna prostática .....	8
2.1. Epidemiología .....	8
2.2. Etiología y Factores de riesgo .....	8
2.3. Clínica .....	9
2.4. Inflamación e HBP.....	9
2.5. Tratamiento .....	11
3. Epidemiología del cáncer de próstata.....	12
3.1. Conceptos generales.....	12
3.2. Incidencia y mortalidad.....	13
3.3. Supervivencia de los pacientes con cáncer de próstata .....	15
4. Factores de riesgo para el cáncer de próstata .....	16
4.1. Edad.....	16
4.2. Raza.....	16
4.3. Factores genéticos .....	17
4.4. Dieta .....	18
4.5. Hormonas .....	20
5. Diagnóstico .....	21
5.1. Tacto rectal (TR).....	21
5.2. Antígeno prostático específico (PSA) .....	21
5.2.1. Velocidad de PSA .....	23
5.2.2. Cociente PSA libre/PSA total (PSA l/t) .....	24
5.3. Biopsia prostática .....	24
5.4. Ecografía Transrectal .....	24
5.5. Tomografía Axial Computerizada (TAC) y Resonancia Nuclear Magnética (RMN).....	25
6. <i>Screening</i> del cáncer de próstata .....	26

7. Estadiaje .....	27
7.1. Clasificación TNM.....	27
7.2. Puntuación de Gleason .....	28
8. Tratamiento del cáncer de próstata.....	29
8.1. Tratamiento de la enfermedad localizada.....	29
8.1.1. Actitud Expectante (AE) .....	29
8.1.2. Vigilancia Activa (VA) .....	29
8.1.3. Prostatectomía radical (PR).....	30
8.1.4. Radioterapia externa (RTE) .....	31
8.1.5. Tratamiento hormonal .....	31
8.2. Tratamiento de la enfermedad diseminada.....	32
8.2.1. Tratamiento hormonal .....	32
8.2.2. Tratamiento citostático.....	33
9. Inflamación y cáncer .....	34
9.1. Interferon- $\beta$ .....	43
9.2. NFkB .....	45
9.3. IL- 1 $\beta$ .....	48
9.4. IL-6.....	50
9.5. IL-10.....	55
9.6. IL- 17.....	58
<b>Hipótesis y Objetivos</b> .....	62
<b>Pacientes y Métodos</b> .....	65
1. Consideraciones éticas .....	66
2. Selección de pacientes.....	66
3. Elaboración de mallas de tejido y tinción inmunohistoquímica.....	70
4. Análisis de la tinción tisular .....	75
5. Análisis estadístico.....	78
<b>Resultados</b> .....	79
1. Casos perdidos .....	80
2. Expresión global de IFN $\beta$ , NFkB, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17 en la HBP y en el CaP .....	81

3. Expresión de IFN $\beta$ , NF $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17 por los distintos tipos celulares .....	85
4. Correlaciones entre las expresiones de IFN $\beta$ , NF $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17. ....	87
5. Relación de la expresión de los factores con las características clínico-patológicas de los pacientes .....	93
6. Correlación entre los niveles séricos pretratamiento de PSA y los diferentes factores en HBP y Cáncer de próstata .....	96
7. Relación de la expresión de los factores a estudio con la recurrencia bioquímica en los pacientes con cáncer de próstata .....	98
8. Relación de la expresión de los factores a estudio con la supervivencia de los pacientes .....	112
9. Análisis multivariante .....	113
<b>Discusión</b> .....	114
<b>Conclusiones</b> .....	128
<b>Bibliografía</b> .....	130

# Agradecimientos

Al Dr. **Francisco Vizoso**, director de esta tesis doctoral, por introducirme en el mundo de la investigación científica, por todos los conocimientos que me ha aportado y por enseñarme a transmitir de la forma más correcta posible el contenido de este trabajo. Sin su confianza, apoyo y dedicación no hubiera reunido la fuerza suficiente para la finalización de esta tesis doctoral.

Al Dr. **Safwan Escaf**, director de esta tesis doctoral, por su colaboración y conocimiento aportado, facilitando la realización de este trabajo.

Al Dr. **Luis Ovidio González**, patólogo de la Fundación Hospital de Jove; y a la Dra. **Nana Beridze**, patóloga del Hospital de Cabueñes, por su colaboración en la interpretación de muestras histológicas.

A **Sara Atienza**, por su desinteresada ayuda y colaboración en la realización de las tinciones inmunohistoquímicas.

A toda la **Unidad de Investigación** de la Fundación Hospital de Jove, por su apoyo, confianza y amistad. Porque sin su estimada ayuda y su buen ambiente de trabajo, la realización de esta tesis doctoral no habría sido posible.

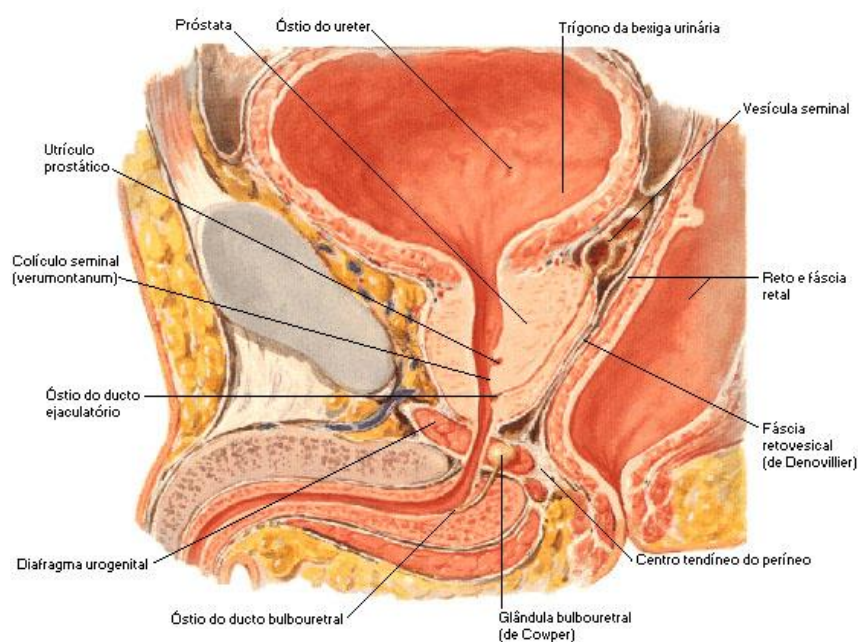


# Introducción

# 1. La Próstata

## 1.1. Situación y relaciones

La próstata es una glándula sexual del hombre localizada en la pelvis anatómica. Se encuentra por debajo del cuello vesical, detrás del pubis y delante del recto. Está atravesada por la uretra prostática y por los conductos eyaculadores. El volumen prostático normal oscila entre 10-15 g (anchura de 3,5-4 cm, diámetro anteroposterior de 2 cm, y altura de 3-3,5 cm) (1).



**Figura 1:** Relaciones y anatomía de la próstata. Imagen de Frank H. Netter, M.D. Atlas de Anatomía Humana. 4ª Edición. Barcelona. 2007.

La próstata está envuelta por una cápsula compuesta de colágeno, elastina y abundante músculo liso. Bandas microscópicas de músculo liso se extienden desde la superficie

posterior de la cápsula para fundirse con la fascia de *Denonvilliers*. Sobre las superficies anterior y anterolateral de la próstata, la cápsula se fusiona con la continuación visceral de la fascia endopelviana. Hacia el ápice, los ligamentos puboprostáticos se extienden hacia adelante para fijar la próstata al hueso del pubis. Por fuera, la próstata es acunada por el haz pubococcígeo del músculo elevador del ano, relacionándose directamente con su fascia endopelviana suprayacente (2). El vértice de la próstata se continúa con el esfínter uretral estriado.

Desde el punto de vista clínico, en el examen rectal, la próstata se encuentra constituida por dos lóbulos laterales, separados por un surco central. También existe un lóbulo medio que puede proyectarse en la vejiga en los hombres de edad avanzada. Estos lóbulos no se corresponden con estructuras histológicamente definidas en la próstata normal, pero suelen estar en relación con el crecimiento patológico de la zona de transición lateralmente, y las glándulas periuretrales centralmente (3).

## **1.2. Estructura**

La próstata está compuesta aproximadamente por un 70% de elementos glandulares y un 30% de estroma fibromuscular. El estroma de la próstata consiste principalmente en células de músculo liso y fibroblastos, junto con otras poblaciones de células endoteliales, nerviosas, y procedentes de la infiltración inflamatoria. Este estroma rodea y recubre las glándulas de la próstata, y se contrae durante la eyaculación para exprimir las secreciones prostáticas hacia el interior de la uretra. El microambiente del tejido estromal, juega un importante papel en la producción autocrina/paracrina de diferentes factores, así como en

la producción de moléculas estructurales encargadas de mantener el comportamiento normal de la célula y la homeostasis de diferentes órganos (4).

La cresta uretral discurre en la longitud de la uretra prostática y desaparece en el esfínter estriado. A cada lado de esta cresta, se forma un surco (senos prostáticos), en el cual drenan todos los elementos glandulares. En su punto medio, la uretra forma una angulación hacia adelante, de aproximadamente 35 grados, dividiendo a la uretra prostática en los segmentos proximal (preprostático) y distal (prostático). En el segmento proximal, el músculo liso se engruesa para formar el esfínter uretral interno o preprostático (2).

Existen pequeñas glándulas periuretrales, englobadas por el esfínter preprostático, que a pesar de que constituyen menos del 1% de los elementos secretores de la próstata, pueden contribuir de manera significativa al volumen prostático en los hombres de edad avanzada, constituyendo uno de los sitios de origen de la hipertrofia benigna de próstata (5).

Posteriormente, la cresta uretral se ensancha y protruye desde la pared posterior como el *verumontanum* o colículo seminal, en cuyo vértice se encuentra un pequeño orificio, que constituye el utrículo prostático. A cada lado del orificio utricular, se encuentran los conductos eyaculadores, que discurren casi 2 cm a través de la próstata.

La próstata está formada por glándulas tubuloalveolares, revestidas por un epitelio cuboide o cilíndrico simple. Entre las células secretoras, se encuentran células neuroendocrinas dispersas, cuya función se desconoce. Por debajo de las células epiteliales, existen células basales aplanadas, revistiendo a cada acino, pudiendo tratarse de células madre del epitelio secretorio (2).

Los elementos glandulares de la próstata, se encuentran divididos en diferentes zonas. Así, en el ángulo que divide a la uretra preprostática y prostática, se encuentra la zona

transicional, representando el 5-10% del tejido glandular de la próstata. Esta zona de transición, da origen, por lo común, a la hiperplasia benigna de próstata (HBP), y se estima que el 20% de los adenocarcinomas de la próstata se originan en ella (5) .

Los elementos glandulares, cuyos conductos se encuentran en la zona central de la uretra, alrededor de los orificios de los conductos eyaculadores, constituyen el 25% del tejido glandular de la próstata; extendiéndose hasta la base de la vejiga. Sólo del 1 al 5% de los adenocarcinomas de próstata se originan en la zona central, aunque puede estar infiltrada por cánceres de zonas adyacentes (5).

La mayor parte del tejido glandular prostático (70%) lo constituye la zona periférica, que se extiende por las caras posterior y lateral de la glándula. Aproximadamente el 70% de los cánceres de próstata se originan en esta zona, siendo también la región más afectada por la prostatitis crónica.

## **2. Hiperplasia benigna prostática**

### **2.1. Epidemiología**

La hiperplasia benigna prostática es una patología cuya elevada prevalencia aumenta con la edad. La HBP afecta a 1 de cada 4 hombres de 50 años, a 1 de cada 3 hombres de 60 años y a más de la mitad de los hombres de más de 80 años. No obstante, raramente aparecen síntomas antes de los 40 años. Aunque la HBP no es una enfermedad mortal, la morbilidad de la misma y su riesgo potencial de complicaciones, disminuyen notablemente la calidad de vida (6, 7).

### **2.2. Etiología y Factores de riesgo**

En cuanto a la etiología y factores desencadenantes de la HBP, se encuentran, no sólo la edad, los factores genéticos y la presencia de andrógenos, como se pensaba en un principio; sino que también son factores de riesgo determinados alimentos, el estilo de vida, el síndrome metabólico y la inflamación (7, 8).

Un aumento en el nivel de insulina basal en plasma, el aumento de peso y de índice de masa corporal, la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión y la disminución del HDL-colesterol, se han constatado como factores de riesgo de un mayor crecimiento prostático (9).

En cuanto a la alimentación, parece que una ingesta rica en carne roja y grasas, podría aumentar el riesgo de crecimiento prostático; sin embargo, el consumo de verduras actuaría como un factor protector para la HBP. El licopeno y los suplementos de vitamina D,

reducirían el riesgo de agrandamiento prostático; sin embargo, la vitamina C, la vitamina E y el selenio, parecen no estar relacionados (10). El consumo de alcohol tampoco se ha relacionado con un mayor crecimiento prostático aunque sí parece que produce un aumento en los síntomas del tracto urinario inferior (STUI) (11).

### **2.3. Clínica**

La HBP es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento histológico de la glándula prostática, consistente en una hiperplasia progresiva, pero discontinua, tanto de las células glandulares como las estromales, conduciendo a una expansión de la glándula prostática que produce una constricción de la uretra y obstrucción al flujo de salida urinario, dando lugar a los denominados STUI. Estos síntomas se dividen en irritativos, como puede ser la polaquiuria, la nocturia, la urgencia miccional o la incontinencia; y los síntomas obstructivos, como la dificultad para iniciar la micción, un chorro miccional débil o intermitente, el goteo post-miccional, la sensación de vaciado incompleto o la retención de orina (12).

### **2.4. Inflamación e HBP**

El crecimiento histológico de la glándula prostática es definido por la proliferación de las células estromales y epiteliales de la próstata, causadas por alteraciones celulares complejas; que incluyen cambios en la proliferación, diferenciación, apoptosis y envejecimiento celular. Los cambios en el compartimento estromal actúan como componentes críticos en la proliferación celular benigna como la HBP, jugando también un

importante papel en la progresión maligna tumoral. Las células del estroma prostático expresan el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH II), moléculas coestimuladoras y la producción de determinadas interleuquinas (IL) proinflamatorias (13, 14).

Gran variedad de factores de crecimiento han sido implicados en la patogénesis de la HBP; así dos miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), concretamente el 2 y el 7, se considera que también desempeñan un papel clave en el crecimiento prostático (13).

Aunque el crecimiento prostático está definido principalmente por la proliferación celular epitelial, también ha sido descrita una amplia relación con el componente inflamatorio celular, aunque todavía no está claro si un origen infeccioso es el evento principal en la inflamación de la próstata humana. En determinados estudios, se ha llegado a la conclusión de que la presencia de infiltrados inflamatorios en la próstata de los pacientes con HBP, se asocian con un aumento en la tasa de progresión de la enfermedad y un mayor riesgo de retención aguda de orina (15). Estos infiltrados inflamatorios de la HBP están formados principalmente por células T, en su mayoría CD4, células B y macrófagos (8, 13).

Sobre la regulación de ciertas citoquinas proinflamatorias, en la HBP se ha relacionado, en particular, a la IL-2 y el IFN- $\gamma$ , pero también a la IL-6, IL-12, IL-15, IL-17 y la IL-23. Además se han relacionado altos niveles de IL-8 tanto en prostatitis crónicas como en HBP. También se ha relacionado con la HBP la activación de los receptores de tipo toll (TLR) (8, 13, 14, 16).

Aunque la patogénesis de la HBP no es bien conocida, actualmente se reconoce la influencia del estroma en el crecimiento hiperplásico de la próstata, de manera que se ha



demostrado que determinados cambios en el estroma conducen a nuevas interacciones estroma-epitelio que dan lugar a la progresión de la hiperplasia. De esta forma, se han objetivado diversos cambios en la producción de hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y otras moléculas, habiéndose involucrado a la inflamación no sólo como un factor añadido de desarrollo y progresión de la HBP, sino también como un factor de agravamiento de los STUI y la necesidad de cirugía (7, 8, 14, 17, 18).

## **2.5. Tratamiento**

En cuanto al tratamiento de la HBP, los alfa-bloqueantes y los inhibidores de la 5-alfa-reductasa, se están convirtiendo en el tratamiento de primera línea, debido a su fácil administración, su eficacia y sus escasos efectos adversos graves. Otros tratamientos son la cirugía con láser, la resección transuretral de la próstata (RTUP), o la prostatectomía abierta (7).

## **3. Epidemiología del cáncer de próstata**

### **3.1. Conceptos generales**

El cáncer de próstata (CaP) es el tercer tumor más frecuente entre los hombres en países desarrollados, y el sexto tumor más común en el mundo. Actualmente, constituye la segunda causa más frecuente de mortalidad por cáncer en los varones, después del carcinoma de pulmón (19).

El CaP supone un importante problema de salud en los países desarrollados, dado que afecta con mayor frecuencia a los varones de edad avanzada. Así, alrededor del 15% de los cánceres en varones, en países desarrollados, se corresponden con CaP; frente a una tasa del 4% en aquellos países en vías de desarrollo (20). La mayor incidencia de CaP se registra en EEUU, Canadá y países escandinavos, y la menor en China y otros países asiáticos (21).

El CaP es diagnosticado infrecuentemente antes de los 50 años de edad (< 0,1% de todos los pacientes). Los hombres que padecen esta patología, suelen tener una edad comprendida entre los 72 y 74 años, y aproximadamente el 85% de los pacientes son diagnosticados después de los 65 años (19).

Es importante resaltar la variable incidencia y mortalidad del CaP en las distintas zonas del mundo, pudiendo estar estas diferencias relacionadas con distintos factores como son: raza afro-americana, exposición ambiental, dieta, estilo de vida, factores genéticos, y la existencia o no de programas de diagnóstico precoz (22).

La edad media de la población y su distribución racial, son factores no modificables. La determinación del antígeno específico de la próstata (PSA) como diagnóstico precoz, los

criterios utilizados para la indicación de la biopsia, y las sucesivas re-biopsias, así como la agresividad de la técnica de biopsia, podrían explicar las diferencias encontradas en la incidencia de CaP en poblaciones similares.

La introducción del despistaje mediante el uso del PSA, provocó, a finales de la década de los 80, un importante impacto en la incidencia de este tipo de tumor. Sin embargo, entre el año 2000 y 2006, se ha producido una bajada del 2,4% anual en la tasa de muerte por cáncer de próstata, lo que se traduce en una estabilización del despistaje con PSA. Este descenso en la mortalidad tiene como principal explicación el menor porcentaje de casos diagnosticados con enfermedad avanzada que, en la actualidad, se aproxima al 5%. Este dato, unido a una alta supervivencia a los cinco años, confirma la evolución favorable, tanto en el diagnóstico, como en el pronóstico del CaP en los principales países desarrollados (23-25).

### **3.2. Incidencia y mortalidad**

En 1989 se creó la *European Network of Cancer Registres* (ENCR), dependiente de la Comisión Europea, con los objetivos de aumentar la eficacia en la búsqueda de los datos de incidencia y mortalidad del cáncer en Europa y promover el uso de los registros de tumores en el control, planificación sanitaria e investigación del cáncer. Estos datos que se recogen de los diferentes países participantes, se incluyen en la base de datos EUCAN.

En la actualidad, la incidencia a nivel mundial del CaP es del 25,3 por cada 100.000 hombres (26). En Europa, el CaP representa actualmente el 22,2% del total de los cánceres diagnosticados en el hombre; siendo su tasa de mortalidad del 9,3% (27).

En España, el Centro Nacional de Epidemiología, dependiente del Instituto de Salud Carlos III, tiene un Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer, para el desarrollo de la investigación sobre las causas del cáncer, tendencias temporales y distribución geográfica en España.

Pero la realidad es que en nuestro país no existe un registro central de tumores que unifique los distintos registros existentes. Además, no es posible conseguir los datos de algunos de los registros locales. En la Comunidad de Madrid (28) y en la de Andalucía (29), se han llevado a cabo dos exhaustivos estudios sobre la incidencia, prevalencia y mortalidad del CaP en estas regiones. En el primero, se obtuvo una tasa de incidencia bruta, ajustada a la población española de 1998, a la población estándar europea y mundial, de 100,4; 120,1; 103,5 y 68,6 casos/100.000 hab., respectivamente (28). La edad media y la mediana al diagnóstico fueron de 70 años. En la edad comprendida entre 70 y 79 años, fue cuando se detectó la incidencia cruda más elevada. Sin embargo, posteriormente podemos observar que su incidencia ha disminuido en los últimos años, encontrándose en aproximadamente 56 casos por 100.000 habitantes en el momento actual. La tasa de mortalidad, ajustada a la población estándar europea por cáncer de próstata en España, fue de 17,57 casos por 100.000 habitantes. Esta mortalidad ha experimentado un descenso progresivo desde el año 1996, donde la tasa era de 24,16 por 100.000 habitantes. A pesar de ello se estima que en el año 2012 ha habido 30.000 nuevos diagnósticos de CaP y 5.500 muertes debidas a esta patología (30, 31).

### **3.3. Supervivencia de los pacientes con cáncer de próstata**

Para conocer la supervivencia de los pacientes con cáncer en Europa, se han desarrollado los proyectos EUROCARE-1, 2, 3 y 4, que han supuesto el seguimiento de todos los casos, incluidos en los registros poblacionales de cáncer de los países europeos participantes, e informan de la supervivencia global de los pacientes oncológicos.

El estudio EUROCARE-4, analiza la supervivencia de 13.814.573 pacientes adultos, diagnosticados de cáncer, entre los años 1978 y 2002, en 23 países europeos. Los registros poblacionales españoles que han participado son Albacete, País Vasco, Castellón, Girona, Granada, Murcia, Navarra, y Tarragona. Según este estudio, la supervivencia de los pacientes diagnosticados de CaP en España, es del 92,7% al año del diagnóstico, y del 82,4% a los 5 años (32, 33). Esta supervivencia ha mejorado respecto a los datos aportados por el estudio EUROCARE-3, que determinaba la supervivencia para los pacientes diagnosticados de CaP en España, entre los años 1990-1994, del 86% al año del diagnóstico y del 65,5% a los 5 años (34).

## **4. Factores de riesgo para el cáncer de próstata**

### **4.1. Edad**

El envejecimiento aumenta el riesgo de CaP. El riesgo varía con la edad, siendo solamente del 0,005% para los menores de 39 años, 2,2% entre los 40 y 59 años, y subiendo al 13,7% para el grupo de edad comprendido entre los 60 y 79 años (35).

La probabilidad de encontrar un CaP cuando se realizan autopsias en hombres fallecidos es mucho mayor, alrededor del 20% entre los 50 y 60 años, y aumenta hasta un 50% en hombres entre 70 y 80 años. Lo que indica un alto grado de prevalencia de la enfermedad subclínica (35).

### **4.2. Raza**

Los índices más bajos de CaP se registran en la población de origen asiático, siendo de 107,2/100.000 habitantes; seguidos de la población hispana con un 127,6/100.000 habitantes, y los caucásicos con 179,9/100.000 habitantes. Pero sin duda, la raza con mayores tasas de CaP, alcanzando cifras de 275,3/100.000 habitantes, es la afro-americana. Los índices de muerte por CaP también son mayores en afro-americanos, siendo hasta cinco veces más alto que los asiáticos, tres veces mayor que los hispanos, y dos veces mayor que los caucásicos. Los afro-americanos, también tienen mayor probabilidad de padecer enfermedad avanzada, según los resultados del programa *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER), del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos; pero sin diferencias en cuanto al grado (36).

La supervivencia a cinco años para los afro-americanos ha mejorado en los últimos 30 años, llegando al 93%; pero sin alcanzar el 98% de los caucásicos (37).

### **4.3. Factores genéticos**

La distribución del CaP en el entorno familiar puede ser debido a la susceptibilidad genética, la exposición a factores ambientales comunes, o esporádica, puesto que la prevalencia de este tumor es muy alta. Aproximadamente el 10-15% de los pacientes con CaP (caucásicos, afro-americanos o asiáticos), tienen como mínimo un familiar que también está afectado (38).

El riesgo de desarrollar CaP en los familiares, aumenta con el número de personas afectadas en la familia, y cuanto menor sea la edad al diagnóstico. Cuando un familiar de primer grado padece un CaP, se duplica el riesgo como mínimo. Cuando dos o más familiares de primer grado se encuentran afectados, el riesgo aumenta entre 5 y 11 veces (39, 40). Una pequeña subpoblación de pacientes con CaP (9%), presenta un auténtico CaP hereditario; es decir, poseen tres o más familiares afectados o al menos dos familiares con enfermedad de comienzo antes de los 55 años (41). Los pacientes con CaP hereditario suelen tener un comienzo 6-7 años antes que los casos espontáneos, pero no difieren en otros sentidos (42).

La tasa de concordancia ha sido comparada entre gemelos monocigóticos y dicigóticos. En un meta-análisis de tres registros dobles en Suecia, Dinamarca y Finlandia (43), la heredabilidad estimada para el CaP fue del 42%, la más alta de todos los cánceres estudiados. Los resultados de varios análisis de segregación (41, 44-46) de los caucásicos que viven en Australia, Suecia y Estados Unidos, apoyan a la herencia autosómica dominante de un gen de alto riesgo. Sin embargo, la frecuencia estimada de los genes fue entre 0,15% y 1,7%, y la penetrancia entre el 63% y el 85% de un gen de alto riesgo. En uno de estos estudios (46), la evidencia de una herencia dominante provenía sobre todo de

los hombres diagnosticados con CaP menores de 60 años de edad, con poca evidencia de factores hereditarios en hombres diagnosticados con esta enfermedad después de los 70 años.

El análisis de vinculación, basado en *scaners* de todo el genoma, ha mapeado loci de susceptibilidad para el CaP, en los cromosomas 1, X, 20, 17 y 8 (47-49).

El gran efecto de los genes en el CaP sugerido por estudios en gemelos, podría también justificarse por polimorfismos en importantes genes para el desarrollo y función de la próstata. Esto daría como resultado diferencias funcionales cuantitativas y cualitativas en la expresión de proteínas en la fisiología del tejido sano. De igual modo, podrían también ser candidatos los polimorfismos en los genes que regulan el metabolismo de los andrógenos, del estrés oxidativo o de la apoptosis (50-52).

#### **4.4. Dieta**

Entre los factores alimentarios que podrían influir en la aparición del CaP, figuran el aporte calórico total, la grasa de origen alimentario, la carne roja, los productos lácteos, algunos micronutrientes y vitaminas (carotenoides, retinoides, vitaminas C, D y E), el consumo de frutas y verduras, minerales (calcio, selenio) y fitoestrógenos (isoflavonoides, flavonoides, lignanos) (53, 54). Un exceso de estos alimentos, influye en la activación o inhibición de determinados factores que intervienen en la homeostasis, controlando la proliferación celular.

Como ejemplo de ello, las dietas ricas en grasas y calorías pueden provocar la liberación de hormonas del crecimiento e insulina, así como la liberación del factor de crecimiento



(IGF). Éste último factor puede disminuir la apoptosis de las células y aumentar la proliferación celular. Por tanto, una reducción en los niveles de IGF, según determinados estudios, no podría evitar la aparición del CaP, aunque sí influiría en su progresión (55).

Los datos del estudio *Physicians' Health Study*, han mostrado que cuanto mayor es la cantidad de consumo de calcio, mayor es el riesgo de CaP (56).

El enzima alfa metil coenzima-a-reductasa tiene una importante función en la peroxidación de los ácidos grasos de cadena ramificada, los cuales están presentes en grandes cantidades en la carne y productos lácteos. Esta enzima se encuentra sobre-regulada en pacientes con CaP, y el peróxido de hidrógeno producido puede dañar la estructura genética de los componentes de la próstata, aumentando así el riesgo de cáncer (19).

En cuanto a las isoflavonas, el mecanismo que se les atribuye en algunos estudios experimentales es la inhibición de las enzimas de la tirosina cinasa, que juegan un papel importante en la proliferación celular y la angiogénesis (57).

Micronutrientes como el selenio o la vitamina E, también parecen estar en relación con el CaP, aunque su papel resulta todavía bastante controvertido. El informe inicial del *Selenio y la Vitamina E para la Prevención del CaP* (SELECT), no encontró ninguna reducción en el riesgo del CaP. Estos datos ponen de relieve la prudencia necesaria para realizar recomendaciones sobre el uso de distintos agentes, para la prevención o el control de la enfermedad, en ausencia de ensayos clínicos con resultados convincentes. (58, 59).

## **4.5. Hormonas**

Los andrógenos tienen un importante papel tanto en el desarrollo y crecimiento de la próstata, como en su tratamiento. La próstata es el lugar de mayor producción no testicular de dihidrotestosterona. La  $5\alpha$ -reductasa es una enzima que convierte la testosterona en dihidrotestosterona, que actúa sobre las células epiteliales prostáticas. La deprivación androgénica con antiandrógenos, como la flutamida y agonistas LHRH (hormona liberadora de gonadotropina), es un tratamiento establecido en el CaP avanzado (60).

## **5. Diagnóstico**

Los principales instrumentos diagnósticos para obtener indicios de CaP, son el tacto rectal (TR), la concentración sérica de PSA y la ecografía transrectal (ETR). El diagnóstico definitivo para su detección, se basa en la presencia de adenocarcinoma en muestras de biopsia de próstata o piezas quirúrgicas. Con el examen histopatológico, se podría llegar a la gradación y determinación de la extensión del tumor.

### **5.1. Tacto rectal (TR)**

La palpación de la próstata mediante el TR puede detectar alteraciones en el tamaño, consistencia o uniformidad. En aproximadamente el 18% de todos los pacientes, se detecta un CaP a partir de un TR sospechoso aislado, con independencia de la concentración de PSA (61, 62).

Se trata de una prueba con mucha variabilidad inter-examinador y con bajo valor predictivo positivo para la detección del CaP (63).

### **5.2. Antígeno prostático específico (PSA)**

El PSA es una serina proteasa afín a la calicreína que producen, casi de forma exclusiva, las células epiteliales de la próstata. Posee especificidad de órgano, pero no de cáncer. Por tanto, las concentraciones séricas pueden aumentar en presencia de HBP, prostatitis y otras enfermedades no malignas (64).

Los inhibidores de la 5-alfa reductasa (Finasteride, Dutasteride), pueden disminuir hasta en un 50% el PSA, tras 6-12 meses de tratamiento (65).

En sangre el PSA puede circular de forma libre (PSA libre) o bien unido a proteínas, alfa-1 antitripsina (PSA complejo) y alfa-2 macroglobulina; siendo la suma de todos el PSA total.

No existe un punto de corte definido del nivel de PSA que indique con certeza la existencia de un CaP. La interpretación del nivel de PSA del paciente se ha de realizar en función de su edad y los valores de referencia que aparecen en la tabla 1 (66).

**Tabla 1:** Niveles de PSA en relación con la edad.

<b>EDAD (años)</b>	<b>PSA total (ng/ml)</b>
<b>&lt; 49</b>	0-2,4
<b>50-59</b>	0-3,4
<b>60-69</b>	0-5,4
<b>&gt;70</b>	0-6,4

Según el *Prostate Cancer Prevention Trial*, la incidencia de CaP en varones mayores de 55 años, con tacto rectal normal y PSA < 4ng/ml, seguidos durante 7 años, fue del 15%, y un 15% de éstos tenían CaP de alto grado (67).

Con el seguimiento postoperatorio del PSA, en la actualidad se puede detectar la recurrencia bioquímica del CaP muchos antes de que la enfermedad se manifieste clínicamente. En pacientes prostatectomizados, se considerará recurrencia bioquímica de la

enfermedad cuando los niveles séricos de PSA superen los 0,2 ng/ml. Por otro lado, en aquellos pacientes cuya intención curativa haya sido la radioterapia o braquiterapia, se considerará recurrencia bioquímica de la enfermedad cuando los niveles séricos de PSA se incrementen en 2 ng/ml sobre el PSA nadir (68, 69).

### 5.2.1. Velocidad de PSA

Es el incremento anual absoluto del PSA sérico (ng/ml/año) (70). Un incremento del PSA  $> 0,75\text{mg/ml/año}$  con un mínimo de tres determinaciones en no menos de 18 meses, incrementa la sensibilidad del test de PSA y facilita la indicación de realizar una biopsia de próstata.

En la tabla 2 se muestran distintos puntos de corte de la velocidad del PSA según la edad (71):

**Tabla 2:** Niveles de velocidad de PSA en relación con la edad

<b>EDAD (años)</b>	<b>VELOCIDAD DE PSA (ng/ml)</b>
<b>40-59</b>	0,25
<b>60-69</b>	0,5
<b>&gt;70</b>	0,75

### **5.2.2. Cociente PSA libre/PSA total (PSA l/t)**

Se utiliza para estratificar el riesgo de CaP en los varones con una concentración total de PSA entre 4 y 10 ng/ml y un TR negativo.

### **5.3. Biopsia prostática**

El método diagnóstico confirmatorio de elección para el CaP es la biopsia sistematizada por vía transrectal y bajo control ecográfico.

El primer valor elevado de PSA no debería conllevar una biopsia inmediata. El valor de PSA debe comprobarse al cabo de unas semanas con el mismo análisis en condiciones normalizadas (72).

Las indicaciones de las biopsias de repetición son la elevación del PSA o PSA persistente, un TR sospechoso, o la proliferación microacinar atípica (ASAP). La neoplasia intraepitelial prostática (PIN) de alto grado como hallazgo aislado, ya no se considera indicación para repetir la biopsia; a excepción de una PIN extensa, ya que aumenta ligeramente el riesgo de CaP posterior (73, 74).

### **5.4. Ecografía Transrectal**

De utilidad para evaluar la presencia de lesiones tumorales en la glándula prostática, así como para valorar su extensión, valorar el volumen de la próstata y calcular la densidad de PSA (PSA/volumen glándula), y realizar las biopsias prostáticas bajo control ecográfico.

## **5.5. Tomografía Axial Computerizada (TAC) y Resonancia Nuclear Magnética (RMN)**

Su utilidad reside en la posterior estadificación tras el diagnóstico del CaP (64). La RMN se debe indicar en pacientes con CaP localizado de alto riesgo de recurrencia, y con cáncer localmente avanzado si se consideran candidatos a intervención quirúrgica. Un diagnóstico en combinación con estas técnicas de imagen puede aumentar las tasas de detección de CaP en pacientes sometidos a posteriores re-biopsias. También deben de ser utilizadas en pacientes con sospecha de valores de PSA sérico e historia familiar positiva (75).

## 6. *Screening* del cáncer de próstata

Si bien la intención de la detección del CaP es disminuir la mortalidad y aumentar la salud en relación con la calidad de vida, el verdadero beneficio del cribado del CaP sigue siendo incierto. El uso del TR como herramienta de evaluación es limitado, debido a la mala fiabilidad, sensibilidad, y a la imposibilidad de palpar tumores pequeños que no han alcanzado la cápsula prostática. La detección del PSA produce un alto porcentaje de falsos positivos y negativos, en función de los umbrales utilizados para definir la anormalidad. El PSA puede detectar determinados tipos de CaP que es improbable que causen problemas de salud importantes incluso si no se tratan, lo que nos conduce al sobre-diagnóstico (76).

En el estudio *The European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC)* en Europa, se han incluido un total de 162.243 hombres entre 55 y 69 años, realizándose *screening* seriados con PSA a un grupo y utilizando otro grupo de similares características como grupo control. Ambos grupos han sido seguidos durante 9 años. Las investigaciones del estudio concluyeron que el *screening* con PSA puede reducir la tasa de mortalidad del CaP entorno al 20%, pero se asocia con un alto riesgo de sobre-tratamiento (77, 78).

En la actualidad, existe generalmente acuerdo en que la detección temprana del CaP en pacientes asintomáticos, debe comenzar a los 50 años. Aunque algunos expertos consideran que los pacientes con riesgo más elevado, como los afro-americanos y los que tienen un familiar de primer grado afectado, deben ser evaluados entre los 40-45 años. Un intervalo de detección de 8 años podría ser suficiente en aquellos hombres con niveles de PSA de 1 ng/ml. Además, la prueba de PSA ya no sería necesaria en pacientes mayores de 75 años y con un valor basal de PSA de 3 ng/ml, debido al bajo riesgo de fallecer a causa de CaP (77).



## 7. Estadiaje

### 7.1. Clasificación TNM

Whitmore (1956) presentó el primer sistema de clasificación de la estadificación clínica del cáncer de próstata, que luego fue modificado por Jewett (1975). La *American Joint Committee for Cancer Staging and End Results Reporting* (AJCC) adoptó el sistema que se basa en la extensión del tumor primario, la afectación de los ganglios linfáticos regionales, y la presencia de metástasis a distancia (TNM) en 1975 (79).

#### Tumor Primario (T)

TX: Tumor primario no puede ser evaluado.

T0: No hay prueba de tumor primario.

T1: Tumor clínicamente no aparente, no palpable ni visible mediante imágenes.

T1a: Descubrimiento histológico incidental del tumor en  $\leq 5\%$  del tejido resecado.

T1b: Descubrimiento histológico incidental del tumor en  $> 5\%$  del tejido resecado.

T1c: Tumor identificado por biopsia de aguja (por ejemplo, a causa de PSA elevada).

T2: Tumor confinado dentro de la próstata.

T2a: El tumor afecta 50% de un lóbulo o menos.

T2b: El tumor afecta  $> 50\%$  de un lóbulo pero no ambos lóbulos.

T2c: El tumor afecta ambos lóbulos.

T3: El tumor se extiende a través de la cápsula prostática.

T3a: Extensión extracapsular (unilateral o bilateral).

T3b: El tumor invade la(s) vesícula(s) seminal(es).

T4: El tumor está fijo o invade estructuras adyacentes distintas a las vesículas seminales: el

cuello de la vejiga, el esfínter externo, el recto, los músculos elevadores o la pared de la pelvis.

### **Ganglios linfáticos regionales (N)**

NX: Ganglios linfáticos regionales no fueron evaluados.

N0: No existe metástasis ganglionar linfática regional.

N1: Metástasis en ganglio(s) linfático(s) regional(es).

### **Metástasis a distancia (M)**

MX: Metástasis a distancia que no puede ser evaluada (no evaluada por modalidad alguna).

M0: No hay metástasis a distancia.

M1: Metástasis a distancia.

M1a: Ganglio(s) linfático(s) no regional(es).

M1b: Hueso(s).

M1c: Otro(s) sitio(s) con enfermedad ósea o sin esta.

## **7.2. Puntuación de Gleason**

La puntuación o score de Gleason se realiza mediante el estudio histopatológico del tejido obtenido en la biopsia prostática, valorando su grado de diferenciación (79, 80):

**GX:** El grado no puede evaluarse.

**G1:** Bien diferenciado (anaplasia leve) (*Gleason 2-4*).

**G2:** Diferenciado moderadamente (anaplasia moderada) (*Gleason 5-6*).

**G3-4:** Diferenciado precariamente o no diferenciado (anaplasia marcada) (*Gleason 7-10*).

## **8. Tratamiento del cáncer de próstata**

### **8.1. Tratamiento de la enfermedad localizada**

El tratamiento del CaP, incluso en la enfermedad clínicamente localizada, es cada vez más complejo debido a las diversas opciones terapéuticas disponibles, que presentan una eficacia oncológica equivalente, pero efectos secundarios relacionados con el tratamiento significativamente diferentes.

La elección de un tratamiento u otro debe realizarse en base al estadio clínico, el *Gleason* del tumor, el PSA y la esperanza de vida del paciente y sus preferencias.

#### **8.1.1. Actitud Expectante (AE)**

También llamada “tratamiento diferido” o “tratamiento guiado por los síntomas”. Su justificación está basada en que el CaP suele progresar lentamente y se diagnostica en varones ancianos en los que existe una incidencia alta de comorbilidad y una elevada mortalidad competitiva relacionada (81) . La AE puede ser una opción para tratar a los pacientes con CaP localizado y una esperanza de vida limitada, o a los ancianos con cánceres menos agresivos.

#### **8.1.2. Vigilancia Activa (VA)**

Su objetivo es reducir la proporción de tratamiento excesivo en los pacientes con CaP de bajo riesgo clínicamente limitado, sin abandonar el tratamiento radical (77). Es decir,

individualizar el tratamiento. Actualmente sólo se dispone de datos no definitivos de ensayos clínicos aleatorizados sobre la VA con un seguimiento < 10 años. Aunque en todos ellos parece llegarse a la conclusión que en pacientes bien seleccionados con enfermedad de bajo riesgo, existe una tasa muy baja de progresión y mortalidad específica del cáncer, así como que tan sólo unos pocos pacientes requieren una intervención radical diferida (82).

Pueden beneficiarse de la VA aquellos pacientes con CaP clínicamente limitado (T1-T2), con una puntuación *Gleason*  $\leq 7$  y PSA < 15-20 ng/ml (81).

### **8.1.3. Prostatectomía radical (PR)**

Es el tratamiento quirúrgico del CaP, que supone la extirpación de toda la próstata entre la uretra y la vejiga, así como la resección de ambas vesículas seminales junto con tejido adyacente suficiente para obtener un borde negativo.

La PR es el único tratamiento para el CaP localizado que ha demostrado beneficios en cuanto a la supervivencia y el riesgo de metástasis, en comparación con la espera y vigilancia. Este beneficio es obvio en los hombres menores de 65 años, pero no está tan claro que el beneficio se extienda a los mayores de 65 años. La PR también supone un claro beneficio en los pacientes con tumores de bajo riesgo (83). La PR debe asociarse siempre a linfadenectomía en los pacientes de riesgo intermedio (T2a, PSA 10-20, Gleason  $\geq 7$ ) o alto (T2b, PSA >20, Gleason >8) (84).

#### **8.1.4. Radioterapia externa (RTE)**

No se han realizado estudios aleatorizados en los que se compare PR con RTE o braquiterapia por CaP localizado. En la RTE la dosis recomendada depende del grado de riesgo del tumor. Así en los tumores de bajo riesgo se recomienda al menos una dosis de 74 Gy; de 76 a 81 Gy en los de riesgo intermedio, y en escalada de dosis para los de riesgo alto (77).

La braquiterapia puede emplearse en aquellos pacientes con bajo riesgo de CaP, en estadio T1c-T2aN0M0, Gleason  $\leq 6$ , PSA  $\leq 10$ ,  $\leq 50\%$  de los cilindros de la biopsia de próstata afectados, volumen prostático  $< 50\text{ml}$  y buena puntuación en el *International Prostate Symptom Score* (85).

#### **8.1.5. Tratamiento hormonal**

En CaP localizado se utiliza como terapia combinada con cirugía o radioterapia y como tratamiento aislado en pacientes con estadios T3-T4, sintomáticos, con enfermedad extensa, PSA muy elevado y mal estado general. Más recientemente, sin embargo, se ha producido un cambio a un uso cada vez mayor del tratamiento hormonal en varones jóvenes con enfermedad más precoz, no metastásica, o recidivante después de un tratamiento definitivo, ya sea como tratamiento en monoterapia primario o como parte de una estrategia multimodal (86).

## 8.2. Tratamiento de la enfermedad diseminada

### 8.2.1. Tratamiento hormonal

La proliferación y supervivencia de la próstata tumoral está regulada por la misma interrelación entre el receptor androgénico (RA) y andrógenos (testosterona) que es responsable del funcionamiento correcto de la próstata normal. Por lo tanto, en el CaP (enfermedad hormono-dependiente), las estrategias terapéuticas comúnmente empleadas están dirigidas a reducir o eliminar la producción y/o acción de la testosterona. La deprivación androgénica (DA), mediante análogos de factores liberadores de la hormona luteinizante (LHRHa) bien solos o en combinación con antiandrógenos (AA), representa en la actualidad el *Gold Standard* del tratamiento hormonal del CaP.

El tratamiento inicial consiste en una castración quirúrgica, mediante orquiectomía bilateral, o bien química mediante la utilización de estrógenos o LHRHa, que es en el momento actual la alternativa terapéutica más empleada.

Otra alternativa a la castración es el uso de antiandrógenos, que compiten con la testosterona y la DHT (dihidrotestosterona) a nivel del receptor presente en el núcleo de la célula prostática, lo que favorece la apoptosis e inhibe el crecimiento del CaP (87). Su uso se puede plantear en pacientes jóvenes, que desean mantener su potencia sexual, como alternativa a la castración.

El bloqueo androgénico completo (BAC) consiste en la asociación de castración con un antiandrógeno puro. Los numerosos estudios en los que se ha comparado el BAC con monoterapia han deparado resultados contradictorios (88). El bloqueo androgénico mínimo (o periférico) se produce combinando finasterida con un antiandrógeno no esteroideo.

### **8.2.2. Tratamiento citostático**

La quimioterapia en el CaP hormono-refractario, puede aumentar significativamente la supervivencia. El esquema estándar de tratamiento es la combinación de docetaxel con prednisona (89).

## **9. Inflamación y cáncer**

La lesión de los tejidos, ya sea física, química o infecciosa, desencadena una secuencia de eventos que constituyen la respuesta inflamatoria. La inflamación es un mecanismo importante que puede eliminar el agente responsable de la lesión e iniciar la reparación de los tejidos mediante una respuesta inmunitaria innata y adaptativa bien coordinada. Cualquier fallo en el preciso control de esta respuesta inmune puede perturbar el microambiente celular, lo que conduce a alteraciones en los genes relacionados con el cáncer, y la modificación postraducciona de proteínas cruciales implicadas en el ciclo celular, reparación del ADN y la apoptosis (90).

La relación entre esta continua irritación de los tejidos y el desarrollo del cáncer ya ha sido sospechada y descrita hace varios siglos. Aulus Cornelius Celsus, un médico romano del siglo I, ya definía la inflamación en su época como “rubor” (enrojecimiento), “tumor” (hinchazón), “calor” y “dolor”. Rodolf Virchow postuló que la microinflamación que resulta de la continua irritación, conduce a la mayoría de las enfermedades crónicas, como puede ser el cáncer (90, 91). Por tanto, aunque este concepto ya se ha sospechado hace muchos años, sólo recientemente los estudios experimentales y clínicos han podido confirmar dicha hipótesis, convirtiendo a la inflamación en un paradigma generalmente aceptado.

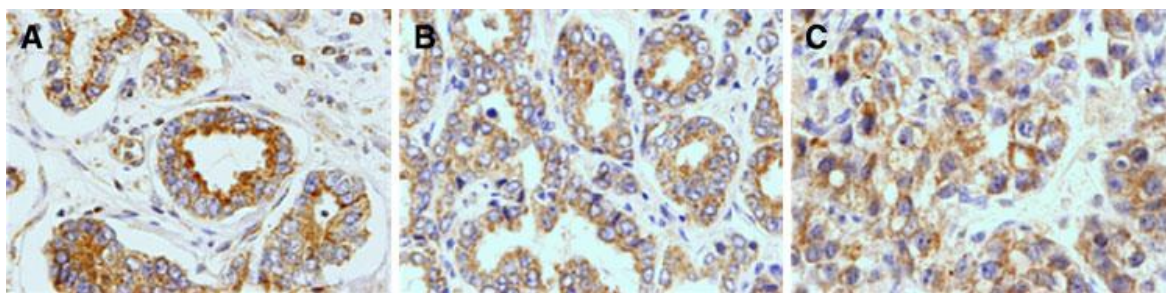
Sin embargo, surgen diferentes preguntas en cuanto a qué subconjuntos de células inmunes promueven directa o indirectamente la inflamación de los tejidos, promoviendo la malignidad de los mismos, y cuáles debido a su plasticidad funcional pueden ser reprogramadas para combatir el cáncer; y en qué grado estas propiedades celulares son genéricas o específicas de tejido. Así, por ejemplo la complejidad de los leucocitos,



encargados de mantener la salud del tejido en condiciones homeostáticas, varía dependiendo del tejido, la ubicación de los órganos o el grado de malignidad del tejido tumoral (92). Las células inmunes, incluyendo los macrófagos, granulocitos, mastocitos, células dendríticas, linfocitos y células *natural Killer* (NK), representan la primera línea de defensa contra patógenos. Si se perturba el ambiente homeostático del tejido, como por ejemplo durante una infección, se activan determinadas células como los macrófagos o mastocitos, capaces de secretar proteínas, citoquinas y quimiocinas que provocan una remodelación de la matriz celular y activan células estromales locales (fibroblastos, adipocitos, células vasculares, etc), para reclutar leucocitos circulantes en el tejido dañado (inflamación aguda), dando lugar a la eliminación de agentes patógenos in situ (daño tisular) (90, 92).

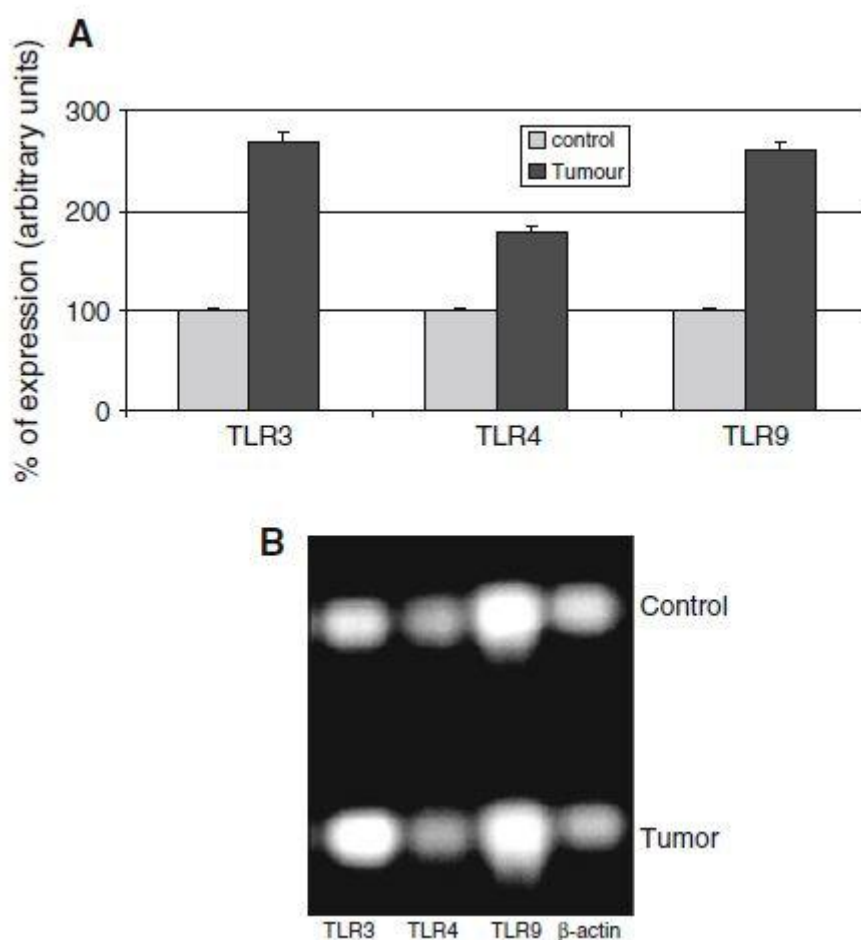
Las citoquinas son un conjunto de proteínas de pequeño peso molecular sintetizadas por multitud de células, especialmente las células del sistema inmune. Su función es inmunorreguladora, siendo fundamentales en la comunicación y en las interacciones que establecen las células del sistema inmune entre sí y con otras células. Las citoquinas dirigen la respuesta inmune innata y la respuesta inmune específica, e intervienen en la inflamación y en la hematopoyesis de distintos tipos celulares. Para ello, activan a macrófagos, eosinófilos, células NK y neutrófilos; inducen la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por parte de los macrófagos, y participan en los procesos hematopoyéticos. Participan en procesos tan importantes como la inflamación, la regulación de la expresión del CMH de clase I y de clase II, las respuestas inmunosupresoras, la regulación del cambio de isotipo de inmunoglobulinas, la quimiotaxis, y la función efectora, normalmente citotoxicidad (93, 94).

Existen evidencias que apoyan el papel de la inflamación crónica en los pacientes con STUI, con prostatitis o con CaP. Así, se han encontrado altos niveles de citoquinas proinflamatorias en las muestras de tejido prostático y en el semen de los pacientes con prostatitis crónica (14, 95); así como en el líquido prostático recogido de las prostatectomías (96). Diferentes virus, como el virus del papiloma humano, virus herpes simple tipo 2 o citomegalovirus; organismos de transmisión sexual como la *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum* y la *Trichomonas vaginalis*; y bacterias Gram negativas, como la *Escherichia coli*, han sido identificadas en la próstata, y la mayoría de ellas pueden considerarse responsables del proceso inflamatorio (14). Además, existen datos que revelan que la presencia de patógenos en el sistema urinario puede contribuir a la transformación maligna del epitelio prostático, a través de la activación de los receptores tipo Toll (TLRs). Este tipo de receptores se consideran un vínculo entre la inmunidad innata (inespecífica) y la inmunidad adaptativa (específica); y contribuyen a la capacidad de eficiencia del sistema inmune para combatir los patógenos. Recientemente Salomé González-Reyes et al (2010); han investigado los niveles de expresión de TLR3, TLR4 y TLR9 en 133 hombres diagnosticados de cáncer de próstata (69). La figura 2 muestra tres ejemplos de inmunotinción para TL3, TL4 y TLR9 en los tumores prostáticos. La tinción positiva se encuentra generalmente en las células cancerosas pero también en algunas células estromales (células similares a fibroblastos, células inflamatorias mononucleares...).



**Figura 2:** a) TLR4 tinción positiva en CaP (x400); b) TLR3 tinción positiva en CaP (x400); c) TLR9 tinción positiva en CaP (x400).

Este mismo estudio (69), muestra en la figura 3 los resultados en tiempo real de la PCR, dando lugar al porcentaje de expresión de TLR cDNA obtenido de tumores prostáticos y patologías benignas. Esta misma figura nos muestra en la parte inferior el análisis electroforético para ambas patologías.



**Figura 3:** Expresión de TLR3, 4 y 9 medida por PCR semicuantitativa en tiempo real, en carcinomas prostáticos y en controles (patologías benignas). La parte superior (a), muestra el porcentaje de expresión de TLR en el control y tumor simple; y la parte inferior (b) muestra las bandas electroforéticas después de PCR en tiempo real que se lleva a cabo con la misma cantidad de cDNA a partir de cada muestra.

Irani et al (1997) con la posterior modificación de Sciarra et al (2007), han propuesto una clasificación para la inflamación prostática, partiendo de la base de una hipotética graduación histológica en función de la extensión de las células inflamatorias; además de otra clasificación en función de la agresividad de las células inflamatorias en el tejido prostático (14) (Tabla 3).

**Tabla 3:** Evaluación histológica y agresividad de la inflamación prostática (adaptada por Sciarra et al (97)).

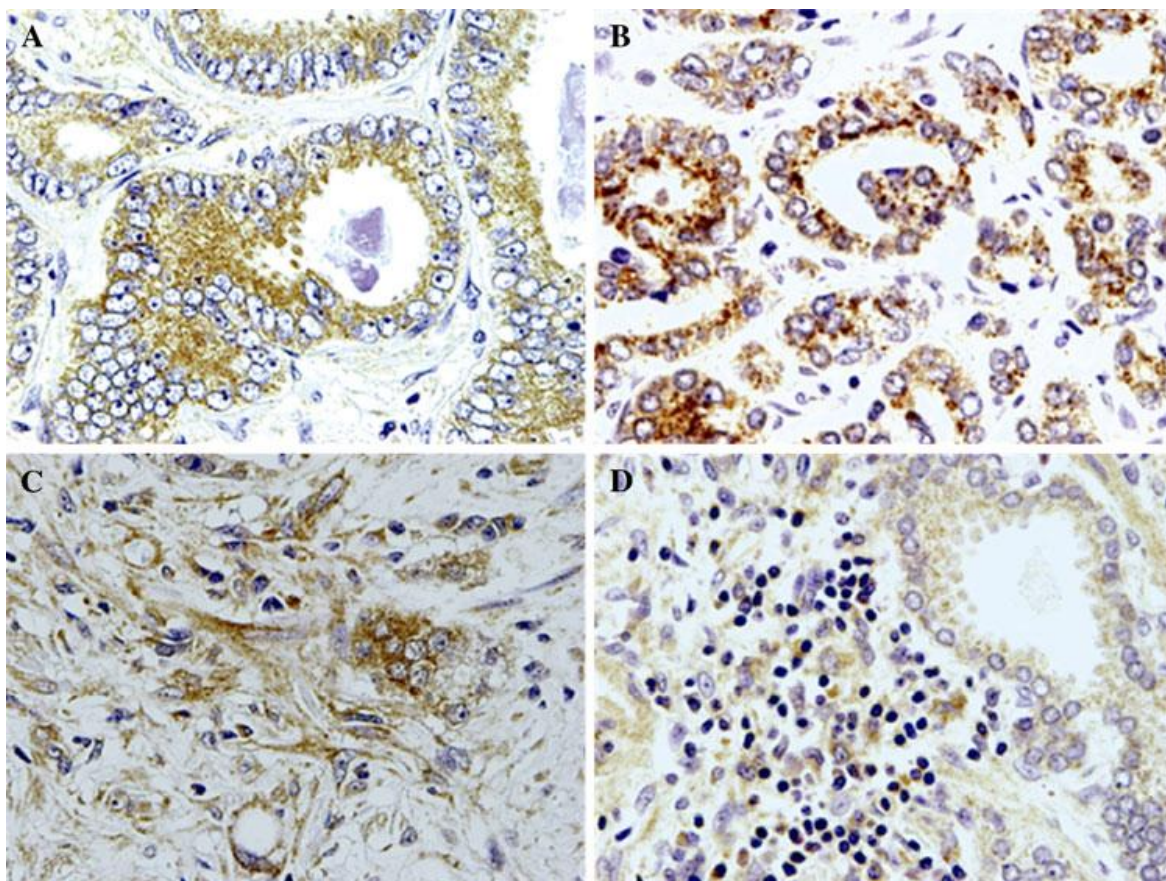
<b>EVALUACIÓN HISTOLÓGICA:</b>
<b>0:</b> No inflamación
<b>1:</b> Infiltrado inflamatorio celular disperso sin nódulos
<b>2:</b> No hay nódulos linfoides confluentes
<b>3:</b> Grandes áreas inflamatorias con confluencia

<b>AGRESIVIDAD HISTOLÓGICA:</b>
<b>0:</b> No hay contacto entre las células inflamatorias y el epitelio glandular
<b>1:</b> Contacto entre inflamación y epitelio
<b>2:</b> Infiltrado intersticial con alteración glandular
<b>3:</b> Alteración glandular en > 25%

Por todo ello, se puede considerar que la inflamación crónica es un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer. En muchos estudios epidemiológicos, el papel de la inflamación crónica en el proceso de carcinogénesis se examinó a través de estudios de las citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, junto con otros factores como las infecciones víricas y los marcadores genéticos que intervienen en la respuesta inflamatoria (69, 98). Así, también ha sido estudiado el papel de las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), Las MMPs son un grupo de enzimas proteolíticos que tienen en común la presencia de dos átomos de zinc en el sitio activo de la molécula, y un residuo característico de cisteína, esencial para el mantenimiento de su latencia enzimática. Son secretadas como pro-

enzimas que requieren un pH neutro para poder actuar, siendo inhibidas por una familia de proteínas denominadas inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs). Las MMPs están ampliamente distribuidas en el organismo humano, interviniendo en diferentes procesos fisiológicos. Sin embargo, el principal interés de las MMPs se ha centrado en el proceso de invasión tumoral y metástasis, ya que pueden degradar determinados elementos de la membrana basal y estroma tumoral, facilitando así la invasión tumoral y metástasis. Por ello, la expresión de varios MMPs y TIMPs en el CaP, tales como MMP-2, 7, 9,13, 14, TIMP-1, 2, 3, se han relacionado con parámetros de agresividad y mal pronóstico en dicho cáncer (99-102).

En otro interesante estudio llevado a cabo por FJ Vizoso, S. Escaff et al (2011) (101) se han realizado más de 3.660 determinaciones prostáticas, y se ha analizado la expresión en función del tipo celular de MMPs o TIMPs tanto en HBP como en CaP. Estos autores han encontrado que a excepción de MMP-7, las células cancerosas prostáticas muestran una expresión significativamente mayor de MMPs y TIMPs que las células epiteliales de la HBP. En la figura 4 se muestran ejemplos de tinción inmunohistoquímica de MMPs y TIMPs por distintos tipos celulares en función de la patología prostática.



**Figura 4:** Ejemplos de tinción inmunohistoquímica. a: expresión positiva de MMP-7 por las células tumorales; 400x. b: expresión positiva de MMP-13 por las células tumorales; 400x. c: expresión positiva de TIMP-3 por los fibroblastos estromales; 400x y d: expresión positiva de TIMP-2 por las células mononucleares inflamatorias (MIC); 400x.

Otros recientes estudios llevados a cabo por Vizoso et al (2010, 2011) también describen una importante asociación entre diversas MMPs y TIMPs y el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata (100, 102).

Esta relación entre la inflamación y el desarrollo del cáncer se afianza con el papel que desempeñan las citoquinas en la promoción de la angiogénesis, metástasis, la subversión de la inmunidad adaptativa y el microambiente tumoral (69).

La elevada prevalencia de infiltrados inflamatorios crónicos en muestras patológicas procedentes de prostatectomías radicales o de resecciones transuretrales, también ha contribuido al establecimiento de un posible vínculo entre la inflamación crónica y el CaP. Esta hipótesis se ve apoyada por las diferentes vías moleculares presentes en ambos procesos. Sin embargo, aunque todavía es controvertido, resulta probable que tanto la HBP como el CaP se vean afectados por la misma población de infiltrados inflamatorios. Estos infiltrados inflamatorios, compuestos principalmente por leucocitos, son los responsables de la secreción de citoquinas involucradas en la regulación paracrina y autocrina del estroma glandular prostático y del crecimiento celular epitelial (14). Por otra parte, los niveles de diferentes interleuquinas, como la IL-1, IL-6, IL-8, IL-15 o IL-17, así como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), podrían estar asociados con la inflamación, los elevados niveles séricos de PSA y la progresión tumoral (103). La inhibición de estas citoquinas podría ser una posible diana terapéutica en el tratamiento del CaP.

Además recientes estudios, tras el análisis de 65 factores relacionados con la inflamación y la progresión tumoral en los carcinomas de mama, han encontrado que la expresión más alta de los factores a estudio se encontraba relacionada con el desarrollo de metástasis a distancia (104, 105). En este sentido, resulta importante considerar las múltiples similitudes entre el cáncer de mama y el CaP, en relación a las asociaciones epidemiológicas, alteraciones genéticas comunes y características bioquímicas comunes (106). De acuerdo con todo esto, los datos preliminares reportados por otro reciente estudio, también han encontrado que la sobreexpresión tumoral de estos factores se ha asociado con la recurrencia bioquímica en los pacientes con CaP (69).

Sin embargo, hasta el momento, sólo podemos plantear la hipótesis de que la inflamación prostática crónica podría considerarse como una condición asociada a la HBP y/o al CaP.



A pesar de ello, lo que sabemos hasta la fecha puede que sea sólo la punta de un gran iceberg; por lo que resultan imprescindibles investigaciones adicionales sobre la respuesta inflamatoria dentro de la próstata para mejorar nuestros conocimientos sobre los mecanismos implicados en la interacción de los infiltrados inflamatorios, el estroma y el epitelio prostático. También resultaría importante aclarar si la inflamación crónica prostática podría ser considerada como el punto de partida para el desarrollo de la enfermedad proliferativa benigna y maligna. Por lo tanto, hasta que no se comprenda mejor la carcinogénesis prostática, el verdadero impacto global de la inflamación en el CaP continúa siendo difícil de alcanzar.

## **9.1. Interferon- $\beta$**

Los interferones (IFNs) son una familia de glicoproteínas naturales producidas por el sistema inmunitario, a la que pertenece el IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  (tipo I) e IFN- $\gamma$  (tipo II). Los de tipo I se relacionan estrechamente y se derivan de genes localizados en el cromosoma 9. Los IFNs reciben su nombre debido a su capacidad para interferir en la replicación de los virus en las células hospedadoras. Es decir, se unen a determinados receptores de superficie de las células infectadas y se activan, impidiendo la replicación de una amplia variedad de virus de ARN y ADN. Fue concretamente esta actividad antivírica del IFN la que condujo a su descubrimiento en 1957 por Alick Isaacs y Jean Linderman mientras estudiaban el fenómeno de la interferencia viral. Pero más tarde los estudios revelaron que por inducción de la diferenciación, la fase de acumulación y la apoptosis, el IFN- $\beta$ , puede inhibir directamente el crecimiento de las células tumorales, regulando a la baja la expresión de las moléculas de la angiogénesis y la invasión tumoral. También inhibe la

expresión de oncogenes y activa a los linfocitos T, las células NK y a los macrófagos. Además el IFN- $\beta$  es capaz de inhibir el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis indirectamente, a través de la activación del óxido nítrico (NO). El IFN también es capaz de aumentar la expresión de los antígenos tumorales y/o de los del sistema HLA (antígenos de leucocitos humanos) (clase I y II), y modula la expresión de un número crítico de genes que influyen en el reconocimiento de las células efectoras inmunes y el ciclo celular (107-109).

En la mayoría de los casos la producción del IFN es inducida por otras citoquinas, como la IL-1, IL-2, TNF y el CSF. El IFN- $\beta$  es producido por distintos tipos celulares, como las células T y B, los macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y osteoblastos entre otras, resultando ser importantes componentes de la respuesta inmune antiviral (107, 109).

En un intento de facilitar nuevos datos sobre terapias efectivas en el CaP, especialmente en aquél resistente al tratamiento hormonal, se han estudiado las distintas acciones individuales y combinadas de diversos moduladores celulares que intervienen en el CaP. Así, tanto el IFN- $\beta$ , como la 1,25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub>, parecen ejercer un efecto antiproliferativo sobre las células del carcinoma prostático. El IFN- $\beta$  también contribuye a la regulación al alza de los receptores androgénicos en el CaP (110). Estos estudios apoyan firmemente el potencial efecto terapéutico del IFN- $\beta$  en el CaP metastásico hormono-refractario.

El IFN también constituye actualmente uno de los tratamientos más utilizados en otras patologías, como la esclerosis múltiple, debido precisamente a su capacidad para reducir la progresión de la enfermedad. Su mecanismo de acción no está del todo claro, aunque se postula que reduciría la proliferación de células T y la producción de TNF- $\alpha$ ,

incrementando la producción de IL-10, y reduciendo el paso de hematíes a través de la barrera hematoencefálica; lo cual corroboraría, una vez más, su función antiproliferativa, inmunomoduladora y antiviral (111).

Existen estudios que defienden que la presencia del IFN- $\beta$  a nivel intralesional, no sólo ayuda a la supresión de los tumores primarios, sino que aumenta la supervivencia en ratones portadores de tumores y los protege de una posible recurrencia bioquímica (112). Sin embargo, otros ensayos clínicos con IFN tipo I han mostrado una respuesta limitada para la mayoría de los tumores sólidos, probablemente debido a la insuficiente acumulación biológica de IFN- $\beta$  en los tumores (112).

Estos datos apoyan la hipótesis de que la presencia sostenida del IFN- $\beta$  en las lesiones tumorales, puede inducir la regresión de las mismas. También implica que el IFN- $\beta$  o el gen que lo codifica, tiene un gran potencial en el tratamiento del CaP.

## **9.2. NFkB**

El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB), es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN. Una proteína identificada por primera vez por Sen y Baltimore en 1986 (113). El NFkB se encuentra presente en la mayoría de tipos de células animales y está implicado en la respuesta celular frente a determinados estímulos como el estrés, citoquinas, radiación ultravioleta y antígenos bacterianos o virales. Además, su correcto funcionamiento interfiere en la transcripción de multitud de genes, incluyendo múltiples citoquinas, factores del

crecimiento, moléculas de adhesión, inmunorreceptores y proteínas de fase aguda. El NFkB juega un papel clave en la regulación de la respuesta inmune debida a la infección, puesto que las cadenas kappa son componentes cruciales de las inmunoglobulinas (114-116).

El NFkB es relevante en la regulación de la respuesta celular ya que pertenece a la categoría de los factores de transcripción primarios de “acción rápida”, como son los factores de transcripción que se encuentran presentes en las células en estado de inactivación, y que no requieren una nueva síntesis de proteínas para ser activados (117).

En la tabla 4, se muestran las citoquinas reguladas por el NFkB.

**Tabla 4:** Citoquinas humanas reguladas por NFkB.

<b>Factores Necrosis Tumoral</b>	<b>Interleuquinas</b>	<b>Quimioquinas</b>	<b>Factores Estimuladores de colonias</b>	<b>Interferones</b>
TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-8	G-CSF	INF- $\beta$
TNF- $\beta$	IL-2	Gro $\alpha, \beta, \gamma$	GM-CSF	
	IL-6	MIP-1		
	IL-12	MCP-1		
		RANTES		

G-CSF (factor estimulador de colonias granulocíticas); GM-CSF (factor estimulador de colonias granulocíticas y macrófagos); Gro  $\alpha$  (péptido  $\alpha$  regulador del crecimiento); MCP (proteína-1 quimiotáctica de macrófagos); MIP (proteína-1 inflamatoria de macrófagos); RANTES (reguladores de la activación, expresión y secreción de las células T).

El NFkB es un factor de transcripción que regula genes responsables tanto de la respuesta inmune innata como de la adaptativa. Tras la activación de los receptores de los linfocitos T o B, el NFkB se activa a través de distintos componentes de señalización. Este factor es ampliamente utilizado por las células como regulador de los genes que controlan la proliferación y supervivencia celular. Debido a ello, existen muchos tipos de tumores en los que el NFkB se encuentra mal regulado; es decir, si el NFkB se encuentra activado, induce la expresión de los genes que evitan la proliferación celular y protegen a la célula. Este factor también parece encontrarse crónicamente activado en numerosas enfermedades inflamatorias; puesto que también controla varios genes implicados en la inflamación. Los defectos de NFkB producen una mayor susceptibilidad a la apoptosis, lo que conduce a un aumento de muerte celular. Esto se debe a que el NFkB también regula genes antiapoptóticos, como el TRAF1 y TRAF2, y por tanto controla la actividad enzimática de las caspasas, que son fundamentales para la mayoría de los procesos antiapoptóticos (118, 119).

Las vías en las que interviene el NFkB, han sido identificadas como vías críticas en la iniciación y progresión del cáncer en humanos, incluyendo el cáncer de próstata. En las células tumorales, el NFkB se activa, bien de forma secundaria a mutaciones en los genes que codifican los factores de transcripción del NFkB, o bien debido a mutaciones en los genes que controlan su actividad; además de ello algunas células tumorales son capaces de secretar factores activadores del NFkB. Por lo tanto, el bloqueo del NFkB puede contribuir a que las células tumorales dejen de proliferar y mueran, incluso que sean más sensibles a determinados agentes antitumorales. Esto hace de este factor un objetivo importante en la terapia contra el cáncer (120, 121).

Pero no sólo se ha identificado el NFκB como un objetivo terapéutico, sino que también se ha demostrado en recientes estudios que el NFκB puede actuar como un factor predictor independiente en la progresión del CaP, lo que sería de gran ayuda para establecer nuevos factores de riesgo e incluso el pronóstico de la enfermedad (122).

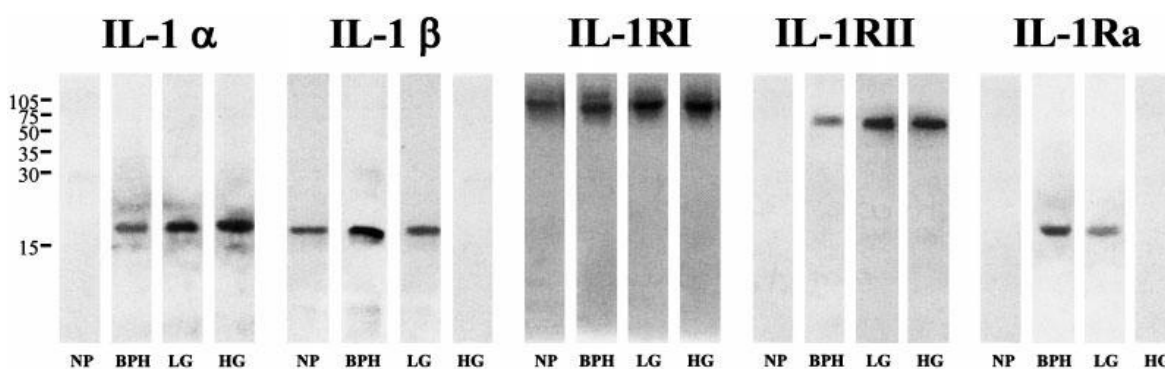
### **9.3. IL- 1β**

La familia de la IL-1 está compuesta por dos factores (IL-1α e IL-1β), dos receptores transmembrana (IL-1RI e IL-1RII) y el receptor antagonista IL-1Ra. La IL-1α se localiza en la membrana celular o en el citosol, y se cree que regula el medio intracelular. Los genes que codifican para cada uno de los miembros de esta familia se encuentran en el brazo largo del cromosoma 2. Los principales productores de IL-1 son los macrófagos, aunque también puede ser sintetizada por los neutrófilos, linfocitos T y B, células epiteliales, fibroblastos, etc, entre otras (123).

Por otra parte, la IL-1β es utilizada por la enzima convertidora de IL-1β (ICE) para transformarla en su forma activa madura, y posteriormente secretarla de forma extracelular. Se ha observado, que los pacientes con enfermedades inflamatorias e infecciosas mostraron mayores concentraciones plasmáticas de IL-1β, pero no de IL-1α, lo que sugiere la función sistémica de la IL-1β (123). La IL-1 es una citoquina pluripotente responsable del funcionamiento fisiológico normal, que puede ir desde la permeabilidad vascular, la aparición de fiebre durante una sepsis, hasta la secreción de citoquinas adicionales en enfermedades autoinmunes. Otras funciones de la IL-1 incluyen la producción y secreción de prostaglandinas, hormonas pituitarias y colagenasas. La IL-1 también estimula el sistema inmunológico para impulsar la producción de los linfocitos.

Por lo tanto, existe un importante equilibrio entre los efectos beneficiosos y perjudiciales de la IL-1 (123).

La expresión de la familia de IL-1 ha sido estudiada en diferentes tumores, entre ellos el CaP, en el que Ricote et al (2004), proponen que la familia de la IL-1 podría estar relacionada con la proliferación celular, pues la expresión de IL-1 $\alpha$  e IL-1Ra es característica en CaP comparado con próstata normal y HBP (124).



**Figura 5:** Análisis electroforético de la familia de IL-1 (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), sus receptores transmembrana (IL-1RI e IL-1RII), y el receptor antagonista de la función de la IL-1 (IL-1Ra). NP: próstata normal; BPH: Hiperplasia benigna de próstata; LG: Carcinoma prostático de bajo grado; HG: Carcinoma prostático de alto grado. Las líneas muestran una banda teñida positivamente para cada grupo.

Las células tumorales producen directa o indirectamente IL-1 $\beta$  (125). Diferentes estudios han documentado que la proteína IL-1 $\beta$  produce, tanto en humanos como en animales, diferentes líneas celulares que incluyen sarcomas, tumores ováricos, y células carcinomatosas transicionales (126). Ejemplos de tumores sólidos en los cuales la expresión de IL-1 $\beta$  se encuentra elevada son los de mama, colon, pulmón, cabeza, cuello y

melanomas. Además, estos pacientes con sobre-expresión de IL-1 $\beta$  tumoral, tienen peor pronóstico (127).

Por tanto, la IL-1 $\beta$  es conocida principalmente por sus funciones en el sistema inmune, donde actúa como una citoquina proinflamatoria. Además se ha descubierto que la IL-1 $\beta$  es capaz de promover la osteoclastogénesis e incluso promover la liberación excesiva de otras citoquinas por parte de los osteoblastos. Basándonos en estos argumentos es posible que antagonizar la actividad de la IL-1 $\beta$ , pueda tener efectos beneficiosos para los pacientes con CaP avanzado, puesto que no sólo debe impedir la función pro-osteoclastogénica de la IL-1 $\beta$ , sino que también interfiere en la comunicación molecular entre el tejido óseo y las células tumorales (127).

## **9.4. IL-6**

La IL-6 es una citoquina multifuncional codificada por un gen localizado en el cromosoma 7p21-14. Puesto que este gen se conoce desde 1986, la IL-6 se ha relacionado a lo largo de todo este tiempo con una larga serie de funciones; algunas de ellas tan contradictorias, como pueden ser la protección contra las infecciones y la promoción de la inflamación en determinadas enfermedades. Durante años, esta citoquina ha sido conocida por tener un papel clave en la maduración de las células B; así como de ser un miembro del triunvirato de citoquinas que dirige la respuesta inflamatoria aguda (TNF, IL-1, IL-6) (128).

Esta citoquina se ha detectado en muchos tipos de células, sin embargo las fuentes primarias de la misma son los monocitos y macrófagos en la inflamación aguda y las células T en la inflamación crónica. La IL-6 desempeña un papel importante en la



regulación de la hematopoyesis, la activación de células inmunes, la inflamación y la carcinogénesis. Además, es capaz de activar la señal de transducción y poner en marcha el activador de la transcripción (STAT), así como también puede activar las vías de señalización de las proteínas Kinasas (MAPK). Toda esta cascada de activaciones conducen a la transcripción de los genes diana responsables de la regulación de la proliferación celular, la supervivencia y el metabolismo. Por consiguiente, alteraciones en la regulación de la señalización de la IL-6, podrían jugar un importante papel no sólo en la iniciación y progresión del CaP, sino también en la aparición de metástasis, la resistencia a la quimioterapia en determinadas células tumorales, enfermedades inflamatorias intestinales, la resistencia a la insulina, la obesidad, o el propio proceso de envejecimiento celular (128-131).

También se ha descrito que la IL-6 juega un papel importante en la patogénesis del CaP, incluyendo en ésta una elevación significativa de los niveles de actividad transcripcional de la IL-6, tanto en tejido cancerígeno como en tejido no maligno en los individuos con CaP, en comparación con los controles de HBP (130).

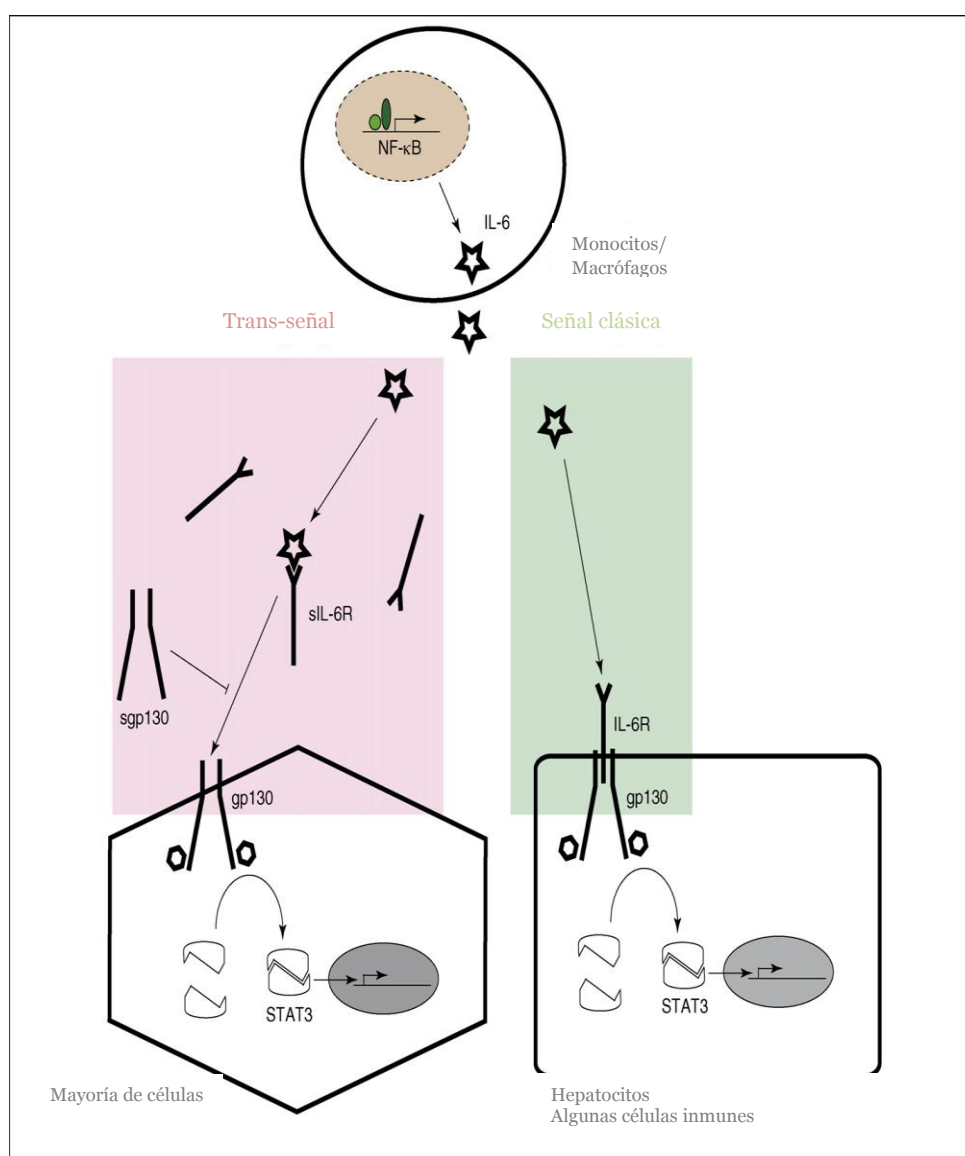
En condiciones homeostáticas, los niveles de IL-6 son bajos, mientras que en condiciones de estrés, infecciones virales...; es decir, toda aquella situación que causa una respuesta inflamatoria, puede aumentar los niveles de la misma. La producción de la IL-6 en los monocitos (y en otras células), depende de varios factores de transcripción, principalmente NFkB C/EPBB y de AP-1. Además, se ha visto que la mayor expresión de la IL-6 en el CaP, también se ha acompañado de una mayor expresión del factor NFkB en los casos de mayor grado Gleason. Esta co-expresión podría tener su explicación en que la IL-6 presenta una región compleja de unión al factor NFkB (128, 132).

Después de que la IL-6 sea secretada por el monocito activado o los macrófagos, puede actuar sobre otras células de forma local o sistémicamente. En la vía clásica de señalización de la IL-6 (Figura 6), la citoquina se acopla a su receptor IL-6R $\alpha$  en la superficie celular. IL-6R $\alpha$  es un receptor sin señalización presente sólo normalmente en los hepatocitos y ciertos leucocitos (neutrófilos, monocitos y células T y B). Un homodímero de la señal transductora del receptor gp130, es reclutado por el complejo IL-6-IL-6R $\alpha$ , seguido por la activación de una quinasa Janus (JAK1), activando al factor de transcripción STAT3 (señal de transducción y activador de la transcripción) mediante fosforilación. La función principal de toda esta unión es promover el crecimiento y la diferenciación y prevenir la apoptosis, además de estar incluida en la inducción de genes como el Bcl2, Bcl-xL, JunB, cFos, IRF-1 (factor de respuesta del IFN-1), TIMP (inhibidor tisular de la metaloproteasa 1, SOCS3 (supresor de la señalización de la citoquina 3), etc.

Sin embargo, también resulta de interés una vía de señalización alternativa de la IL-6, llamada IL-6 trans-señalización, en la que interviene el receptor soluble de la IL-6 (sIL-6R $\alpha$ ). Aquí, el sIL-6R $\alpha$  que se encuentra en el suero puede unirse libremente a la IL-6 y este complejo, a su vez, puede señalar cualquier célula que tenga gp130 en su superficie, lo que incluye la mayoría de las células. Esta vía alternativa es probablemente, la responsable de la mayoría de los efectos patológicos de la IL-6 vistos, por ejemplo, en la inflamación crónica (128).

Los niveles elevados del sIL-6R encontrados en prostatectomías de pacientes con CaP, también han sido relacionados con un mayor grado Gleason en dichos pacientes. Dicha relación se ha visto reforzada mediante el cálculo de la relación sIL-6R/IL-6 (133). Una extensa búsqueda en la secuencia reguladora de la IL-6, podría proponer que la variante 6331T > C (rs10499563), podría tener cierta responsabilidad en la variabilidad de la

expresión de la IL-6. A pesar de que la presencia del alelo 6331-C se ha relacionado con un aumento en el riesgo de CaP y una menor probabilidad de supervivencia (posiblemente indicativo de una enfermedad más agresiva), se observa que este alelo también se asocia con una disminución en los niveles de transcripción de IL-6, probablemente atribuido a una afinidad de unión más débil hacia dicho factor (130).



**Figura 6:** Diferentes vías de señalización de la IL-6.

Recientes estudios también sugieren que los polimorfismos presentes en genes que codifican mediadores inflamatorios, como la IL-6, pueden influir en los niveles plasmáticos y en la actividad biológica de las proteínas correspondientes. En este contexto, los genes de citoquinas deben considerarse genes importantes, candidatos para la susceptibilidad del CaP y la gravedad del mismo (129). Así, un común polimorfismo de la IL-6 que afecta a la posición -174 ha sido investigado en una amplia variedad de enfermedades, tales como el cáncer de mama, la parálisis cerebral, y la artrosis de cadera o de rodilla. Este polimorfismo también ha sido estudiado en el CaP en diferentes estudios, sin embargo los resultados de los mismos han sido contradictorios (129, 131). La explicación más plausible es que el efecto de un solo polimorfismo podría tener un efecto más limitado en la susceptibilidad del CaP.

Aunque la IL-6 se ha relacionado con la progresión del CaP, también se ha informado de su papel antitumoral en determinados procesos malignos, como es el caso del carcinoma de células renales (134), y sus funciones como mediador de la inflamación y supresión del crecimiento tumoral (128). Estos resultados apoyan el papel pleiotrópico que juega la IL-6 en la inmunidad tumoral, pudiendo incluso inducir señales opuestas.

No obstante, dado que el CaP es una enfermedad heterogénea en la que múltiples vías de transducción pueden contribuir a una apoptosis incontrolada o a una alteración en la proliferación celular, se ha llegado a la conclusión de que los objetivos deben de ir dirigidos hacia la inactivación de proteínas pro-inflamatorias, que podrían poner fin a este alterado proceso.

## 9.5. IL-10

La IL-10 es una importante citoquina inmunorreguladora localizada en el gen 1q31-32.8. Está producida principalmente por las células T activadas, monocitos, células B y timocitos. Posee propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras que actúan en las células presentadoras de antígeno (células dendríticas, macrófagos y células T) mediante la inhibición tanto de la síntesis de citoquinas como de moléculas co-estimuladoras de macrófagos y moléculas HLA de clase II. Esta inhibición también afecta a la producción de ciertas citoquinas como son IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, INF, TNF- $\alpha$ . Así mismo, actúa directamente en la proliferación y diferenciación de la respuesta inmune tipo Th1, Th2 y Th17 (135, 136).

La producción de IL-10 está asociada con los niveles de transcripción de esta proteína, los cuales, a su vez, se han relacionado con polimorfismos genéticos localizados en la región promotora de la proteína. Se ha informado, en particular, de la asociación de tres polimorfismos en las posiciones -1082, -819 y -592, con los niveles de IL-10; y se ha encontrado que el haplotipo -1082A/-819T/-592A (ATA), está asociado con la disminución de la producción de IL-10, al compararlo con el haplotipo -1082G/-819C/-592C (GCC) (137). El polimorfismo -1082 se encuentra en el sitio de reconocimiento ligado al factor de transcripción *Ets*. Similarmente, el polimorfismo -592 está localizado en la secuencia consenso de los miembros de la familia *Spl*, que incluye factores de transcripción que participan en la regulación negativa de la expresión de la proteína. Por último, el polimorfismo -819 puede afectar a un elemento del receptor de estrógenos. Los análisis también han demostrado mayores probabilidades de desarrollo de CaP y un mayor grado del mismo (grado III, equivalente aproximadamente a un grado Gleason 7-10) para las personas con las variantes genotípicas homocigotas -819 o -592 (138-140).

La variación de la IL-10, concretamente el gen que codifica a dicha citoquina antiinflamatoria, se ha asociado con el mayor riesgo de CaP en algunos estudios, y con el riesgo de recurrencia en los escasos estudios realizados hasta la fecha (141). En el estudio de casos y controles, llevado a cabo por Dluzniewski et al. (2012), se ha llegado a la conclusión de que la IL-10 se asocia con un mayor grado de recurrencia después del tratamiento quirúrgico del Ca. Específicamente, el alelo menor (A) de la IL-10, rs1800872, que se encuentra en la región promotora y produce menos IL-10 que el alelo mayor (G), se asoció con un mayor riesgo de recurrencia (141). Por otro lado, en el polimorfismo de la IL-10, rs1800871, se ha observado una tendencia a disminuir el riesgo de CaP en la población asiática, aunque no de forma significativa (136). Mediante la implantación de células cancerosas de próstata humana en ratones inmunocomprometidos, Stearns et al., demostraron que aquellos ratones con células que expresaban IL-10 tenían tumores más pequeños, menos metástasis y un aumento en la supervivencia, en comparación con los ratones a los que se les habían implantado células de control. Esto demostraría que niveles elevados de IL-10, podrían tener un efecto antitumoral en el CaP (140).

La IL-10 posiblemente puede actuar a través de una vía de señalización específica, que en última instancia, es capaz de prevenir las metástasis del tumor mediante la inhibición de la angiogénesis, así como los mecanismos implicados en la recurrencia tumoral (141).

Varios estudios han demostrado que la IL-10 puede estar involucrada en la patogénesis de determinados procesos oncológicos; sin embargo, muchos de estos estudios presentan resultados inconcluyentes (142). Los estudios demuestran que los niveles elevados de IL-10 pueden facilitar el desarrollo del cáncer mediante la supresión de la expresión del mayor complejo de histocompatibilidad (MCH) de clase I y II; y previniendo la tumoración antigénica presentada por linfocitos T CD8 citotóxicos. Sin embargo, los efectos

antiangiogénicos de la IL-10 parecen jugar un papel protector y preventivo contra determinados procesos oncológicos (136).

Genotipos productores de bajos niveles de IL-10 se han asociado con una mayor susceptibilidad de determinados procesos tumorales, como el melanoma cutáneo maligno o el carcinoma de células renales. Por otro lado, para otros tumores sólidos, como el cervical, carcinoma gástrico o carcinoma hepatocelular secundario a infección por virus de hepatitis B, los niveles elevados de IL-10 se asocian con peor pronóstico (140).

Las discrepancias en cuanto a la IL-10 y al CaP también se encuentran presentes en los diferentes estudios. Estas diferencias pueden ser debidas a la existencia de varios polimorfismos genéticos de la IL-10 entre poblaciones específicas, grupos étnicos y regiones geográficas. El CaP es una enfermedad multifactorial, y la exposición individual a los diferentes factores ambientales, en combinación con la susceptibilidad genética, puede dar lugar a discrepancias en los resultados (136). Además, otros factores tales como el tamaño de la muestra, diferentes grados de CaP y el sesgo de publicación, también pueden haber contribuido a estas discrepancias. Por lo tanto, parece ser que la IL-10 tiene la capacidad de influir tanto positiva como negativamente en la inmunidad innata y adaptativa.

## 9.6. IL- 17

La transcripción del factor NFkB ha sido identificada como un potencial puente molecular entre la inflamación y el cáncer. Por ello, la señalización de este factor resulta crucial para una nueva vía de acción de citoquinas pro-inflamatorias, como puede ser la señal de la IL-17, la cual parece favorecer el desarrollo de la inflamación crónica intraprostática (143).

La familia de la IL-17 está compuesta por seis miembros (IL-17A o IL-17, IL-17B, IL-17C, IL-17D e IL-17F). La IL-17R es el receptor para la IL-17A; que junto con otros cuatro receptores-*like* homólogos (IL-17Rh1 o IL-17BR, IL-17RL o IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE) ha formado una nueva familia de receptores que difiere de las habituales (144).

La IL-17 es capaz de estimular determinados tipos celulares, como las células epiteliales, las células endoteliales o las células fibroblásticas, para secretar una amplia variedad de moléculas pro-inflamatorias, incluyendo a la IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, óxido nítrico sintetasa, ciclooxigenasa-2 y CD-54. Además, la IL-17 parece que puede inducir citoquinas hematopoyéticas, tales como colonias estimulantes de granulocitos y macrófagos o la IL-6 (145). Así, la IL-17 parece proporcionar una relación directa o indirecta entre las células T y la respuesta inflamatoria y hematopoyética.

La IL-17 es producida por células T *helper* (TH) 17 y por otras células inmunológicas. La IL- 17 expresa células CD4+ (TH17), las cuales han sido propuestas en los últimos años para conformar un tercer linaje junto con las células TH1 y TH2 (146, 147). Además de las células TH17, existen una gran variedad de células T, como pueden ser las CD8+ citotóxicas (TC17), células T *natural killer* (NKT), y células de la inmunidad innata, como los neutrófilos o monocitos; que tienen la capacidad de producir IL- 17 bajo determinadas condiciones patológicas. Además, determinados estudios han demostrado que la expresión



de la IL-17 por los macrófagos, promueve una mayor invasión celular en el cáncer de mama y aumenta la densidad de los microvasos en el cáncer de mama y de colon (148). El papel pro-tumorogénico de la IL-17 también ha sido demostrado en los estudios realizados por Xiao et al (149), que defienden que la presencia de anticuerpos anti-IL-17 contribuye a disminuir la inflamación y retrasa la aparición de papiloma en la piel de los ratones a estudio. La neutralización de la IL-17 en ratones, también inhibió la formación de cáncer de colon (150). Tomados en conjunto, todos estos recientes hallazgos apoyan la opinión de que la IL-17 promueve la formación y crecimiento de determinados tumores, como son el cáncer de piel, el adenocarcinoma intestinal, el adenocarcinoma prostático, el cáncer de cuello uterino y el cáncer de ovario (145).

En su papel de citoquina pro-inflamatoria, la IL-17 también ha sido implicada en determinadas enfermedades autoinmunes que incluyen a la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la respuesta inmuno-alérgica de la piel, la psoriasis, el rechazo en trasplantes de órganos y el proceso inflamatorio en relación con infartos (145).

En el estudio llevado a cabo por Vykhovanests. et al (143), se ha demostrado que los agregados de macrófagos y neutrófilos que se encuentran en estrecha relación con la PIA (atrofia inflamatoria proliferativa), constituyen el mayor productor de IL-17 en el adenocarcinoma prostático.

Estudios previos demuestran que el 79% de las muestras de HBP y el 58% de las muestras de CaP, presentan altos niveles de IL-17. Por el contrario, el tejido normal de la próstata presenta bajos niveles de IL-17 restringida a los linfocitos (151). En el estudio de Vykhovanests. et al. se ha llegado a la conclusión de que la acumulación de IL-17 que expresan macrófagos y neutrófilos, presenta niveles más altos en las lesiones de PIA, en

comparación con las densidades de estas células dentro del adenocarcinoma de próstata o en el tejido prostático benigno no afectado por PIA (143). Estos hallazgos sugieren que en las áreas de tejido prostático tumoral, las lesiones de PIA y las áreas de tejido prostático benigno no afectado por PIA, pueden presentar microambientes diferentes.

Otros estudios también apoyan la importancia de los macrófagos intra-luminares en las lesiones de PIA, en pacientes con carcinoma prostático. Incluso han estudiado en el epitelio de pacientes con HBP la capacidad de expresión de estos macrófagos, no sólo para expresar de forma independiente la ciclooxigenasa-2; sino también la capacidad de expresión tras la inducción de la misma (152).

Se ha demostrado que los niveles de las células TH17 aumentan notablemente durante el desarrollo tumoral. Además, la IL-17 regula la producción de citoquinas pro-inflamatorias y factores proangiogénicos, capaces de promover el desarrollo tumoral (153, 154). Un reciente estudio ha mostrado que los linfocitos presentes en el tejido prostático de pacientes con CaP, se encuentran sesgados hacia el fenotipo TH17. Sin embargo, la preponderancia de TH17 mediados en la inflamación, se asocia con un menor Gleason patológico (155). Por otro lado, en el estudio llevado a cabo por Qiuyang Zhang et al, se ha observado que los ratones con receptores para la IL-17 negativos, desarrollaron tumores prostáticos más pequeños que los que presentaban receptores positivos (147).

Además, la IL-17RL parece ser un nuevo gen antiapoptótico. Dado que su expresión se encuentra inducida por la privación de andrógenos, y se encuentra altamente expresada en las líneas celulares y tumorales andrógeno-independientes; resulta razonable especular que la IL-17RL se encuentra potencialmente asociada con el CaP andrógeno-

independiente. Por ello, la IL-17RL podría ser una diana terapéutica en el tratamiento de este tipo de cáncer prostático (144).

Hasta la fecha son muy escasas las investigaciones publicadas sobre la prevalencia de la expresión de la IL-17 en las células cancerosas prostáticas; y por consiguiente, son muy escasos los datos disponibles sobre su fenotipo o localización en el adenocarcinoma prostático. Según determinados estudios publicados, la IL-1 $\beta$ , inducida por el NF $\kappa$ B, favorece la acumulación de IL-17 en el estroma prostático; por lo que queda abierta la hipótesis de que las células productoras de IL-17, pueden ser un objetivo específico en las señales proinflamatorias que inician la inflamación intraprostática (156).

# **Hipótesis y Objetivos**

El CaP es una de las formas más comunes de cáncer en hombres y una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel mundial, pero las distintas vías que componen su etiopatogenia son todavía en gran parte, desconocidas.

Los factores inflamatorios que actúan sobre la glándula prostática se han relacionado con un mayor riesgo de malignización de la misma. De hecho, las citoquinas aunque se conoce sobre todo su función en la migración de leucocitos, existe una creciente evidencia de su papel crítico en el desarrollo de tumores y metástasis, entre los que se incluye el CaP.

La inflamación prostática ha sido considerada una posible diana en la prevención y tratamiento tanto en la HBP como en el CaP, por lo que hasta el momento se han probado diferentes agentes antiinflamatorios tanto in vivo como in vitro. Desafortunadamente, los estudios hasta ahora no son suficientes y existen pocos datos disponibles para evaluar la respuesta clínica de estos antiinflamatorios en ambos procesos prostáticos.

Un mejor conocimiento de los biomarcadores que intervienen en la HBP y en el CaP, así como el mejor conocimiento de su patogenia, constituyen procesos necesarios para llegar a una correcta estratificación del riesgo de estas patologías entre los hombres con enfermedad localizada, y la revelación de posibles dianas terapéuticas.

El objetivo de este estudio ha sido establecer el patrón diferencial de expresión del IFN $\beta$ , el NF $\kappa$ B, la IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y la IL-17, en el tejido hiperplásico y tumoral prostático. Para ello, hemos realizado un estudio inmunohistoquímico usando *arrays* de tejido y anticuerpos específicos contra los factores a estudio. Más de 2.000 determinaciones, han sido realizadas, en muestras prostáticas de intervenciones quirúrgicas y biopsias diagnósticas de 118 pacientes con carcinoma prostático y de 50 pacientes con hiperplasia prostática.

Los objetivos concretos han sido los siguientes:

1. Determinar la expresión global de los factores a estudio (IFN $\beta$ , NF $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-17) en el tejido prostático tumoral y en el hiperplásico.
2. Determinar la expresión de los distintos factores de inflamación por las células epiteliales, los fibroblastos y las células mononucleares inflamatorias, presentes en la HBP y en el tejido tumoral prostático.
3. Determinar la relación en la expresión simultánea de los distintos factores a estudio, tanto en la HBP como en el CaP.
4. Relacionar la expresión de estos factores de inflamación de la HBP y del tejido tumoral con las características clínico-patológicas de los pacientes.
5. Relacionar la expresión de las proteínas relacionadas con el proceso inflamatorio en el CaP con la recurrencia bioquímica y la supervivencia.

# **Pacientes y Métodos**

## **1. Consideraciones éticas**

Los pacientes han sido tratados de acuerdo con la aprobación de las guías y nuestras instituciones. El estudio se adhiere a las regulaciones nacionales y ha sido aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Fundación Hospital de Jove.

## **2. Selección de pacientes**

En este estudio retrospectivo el material histológico utilizado ha sido obtenido de las biopsias prostáticas de 50 pacientes afectados de HBP (intervalo de edad 44-84 años), entre los años 2003 y 2007 y de 118 pacientes con adenocarcinoma prostático localizado (intervalo de edad 44-79 años), entre los años 1999 y 2005. Se han seleccionado pacientes con adenocarcinoma prostático que han sido sometidos a prostatectomía radical retropúbica y han sido seguidos durante un mínimo de 5 años sin presentar recurrencia bioquímica.

### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Los criterios de exclusión que hemos seguido han sido los siguientes:

- Enfermedad metastásica en el momento de la presentación de la patología prostática.
- Historia clínica anterior de cualquier otro tipo de tumor maligno.
- Haber recibido cualquier tipo de terapia neoadyuvante.
- Desarrollo de un segundo cáncer primario.
- Ausencia de suficiente tejido en los bloques de parafina.



De un total de 172 pacientes afectados de CaP y que cumplían estos criterios, se seleccionó al azar una muestra de 118 pacientes, divididos en dos grupos de similar tamaño y estratificados en función de la presencia de recurrencia bioquímica, que es la variable clave del estudio. De estos pacientes, 40 presentaron recurrencia bioquímica (PSA > 0,2 ng/ml, con una segunda determinación confirmatoria).

Los pacientes proceden de la Fundación Hospital de Jove, Gijón. Las historias clínicas se obtuvieron de los archivos de Historias Clínicas, de los archivos de Anatomía Patológica, y de los archivos del Servicio de Urología.

En la tabla 5 están representadas las características clínico-patológicas de los pacientes con HBP, así representamos la edad y el PSA previo a la biopsia diagnóstica en estos pacientes.

**Tabla 5:** Características basales de los 50 pacientes con HBP.

<b>Características</b>	<b>Pacientes</b> Nº (%)
<b>Edad (años)</b>	
≤ 67	25 (50%)
< 67	25 (50%)
<b>PSA (ng/ml)</b>	
≤ 10	45 (90%)
> 10	5 (10%)

Las principales características de los pacientes con CaP, respecto a edad, estadio tumoral, score de Gleason, localización tumoral y nivel de PSA (ng/ml) previo a la biopsia diagnóstica, están representadas en la Tabla 6. Los tumores fueron organizados de acuerdo a la clasificación TNM de 1992 (157). La clasificación histológica del tumor se realizó mediante los criterios de Gleason. Un solo uropatólogo asignó la puntuación Gleason en los puntos de la matriz de tejido teñido. La localización tumoral se dividió en unilateral, siendo aquellos tumores que afectan a un solo lóbulo prostático; y bilateral, aquellos tumores que afectan a ambos lóbulos. Los niveles séricos de PSA se determinaron antes y después de la intervención, utilizando “Elecys”, pruebas inmunológicas (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). Un mes más tarde del tratamiento quirúrgico, se encontró que todos los pacientes tenían niveles indetectables de PSA sérico. Por último, todos los casos fueron evaluados por recurrencia de la enfermedad o supervivencia según criterios clínicos, radiológicos y biológicos, siendo evaluados cada 6 meses. La mediana de seguimiento en meses fue de 46,5 (rango 6-123 meses).

**Tabla 6:** Características basales de los 118 pacientes con carcinoma prostático.

<b>Características</b>	<b>No recurrencia bioquímica</b> (n= 78) N° (%)	<b>Recurrencia bioquímica</b> (n= 40) N° (%)
<b>Edad (años)</b>		
≤ 67	45 (57,7)	16 (40)
> 67	33 (42,3)	24 (60)
<b>Estadío tumoral</b>		
T2	72 (92,3)	24 (60)
T3-4	6 (7,7)	16 (40)
<b>Score de Gleason</b>		
2-4	27 (34,6)	12 (30)
5-6	40 (51,3)	18 (45)
7-10	11 (14,1)	10 (25)
<b>Localización tumor</b>		
Unilateral	64 (82,3)	29 (72,5)
Bilateral	14 (17,7)	11 (27,5)
<b>PSA (ng/ml)</b>		
≤ 10	59 (75,6)	24 (60)
> 10	19 (24,4)	16 (40)

### 3. Elaboración de mallas de tejido y tinción inmunohistoquímica

Con el objetivo de determinar la expresión del IFN $\beta$ , el NF $\kappa$ B, y las interleuquinas 1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17 en las muestras de tejidos de los pacientes a estudio, hemos elaborado mallas de tejido, bloques o *arrays* de tejido, lo que nos ha permitido procesar las 118 y 50 muestras de pacientes a la vez. A pesar de partir de 122 casos de pacientes con CaP, hemos sufrido la pérdida de 4 de ellos, debido fundamentalmente, a que la zona tumoral era demasiado pequeña para poder realizar un *punch* de la misma.

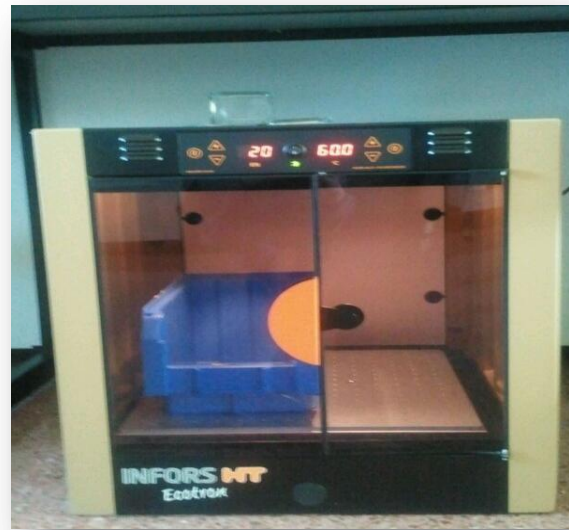
Las muestras de los tejidos se fijaron en formol tamponado al 4% durante un mínimo de 24h. Tras esto, se realizó un estudio macroscópico, incluyendo en parafina las secciones representativas para el diagnóstico anatomopatológico. Para su inclusión se llevó a cabo el siguiente proceso: Formol 15'- Alcohol 70°C 30'- 96°C 30'- 96°C 30'- 100°C 30'- 100°C 30'- 100°C 45'- Xilol 60'- Xilol 60'.

Tras la obtención de bloques de tejido y con la ayuda de un microtomo (Leica Microsystems GMBH, Wetzlar, Alemania), se cortaron muestras a un grosor de 3 $\mu$ m, siendo posteriormente teñidos con hematoxilina-eosina para seleccionar las zonas hiperplásicas y tumorales más representativas.



**Figura 7:** Microtomo y baño de flotación

Usando éstos como mapa en los bloques de parafina correspondientes, elaboramos el *array* mediante *manual tissue microarray* (Modelo MTA-1, Beecker instruments, Sun Prairie, Wisconsin, USA). El procedimiento consiste en que se extrae un cilindro de parafina del bloque receptor, que es rellenado por otro cilindro con el tejido



*Figura 8: Estufa*

extraído del bloque donante, en nuestro caso con tejido hiperplásico y tumoral prostático. De forma paralela a la realización del *array*, se va cubriendo una plantilla previamente elaborada, en la que se escribe la situación de cada cilindro y su número de biopsia correspondiente. Cada uno de los casos es introducido en el *array* por duplicado. Una vez han sido introducidos todos los casos, el bloque se coloca en una estufa a 60°C, lo que favorece una correcta unión de los cilindros al resto del bloque de parafina, realizándose un posterior enfriamiento de éste, y dando como resultado secciones de 3 µm de espesor.

Los cortes son recogidos en portaobjetos pretratados específicos para su uso en el inmunoteñidor.



**Figura 9:** (a) Elaboración de “array” mediante “manual tissue array”; (b) Tinción inmunohistoquímica realizada sobre un “array”.

Sobre estas secciones, se ha realizado el estudio inmunohistoquímico utilizando para ello anticuerpos específicos frente a  $IFN\beta$ ,  $NF\kappa B$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-10$  e  $IL-17$ .

Esta técnica lleva a cabo la aplicación de los principios y técnicas inmunológicas al estudio de células y tejidos.

Tiene por objetivo la identificación, localización in situ y cuantificación de células y/o tejidos; de determinados antígenos, o compuestos específicos mediante la reacción antígeno-anticuerpo. Para poder localizar el complejo antígeno-anticuerpo, es necesario unir moléculas trazadoras o marcadoras a los anticuerpos, de forma que permitan visualizar el lugar de la reacción con sus respectivos antígenos. Las moléculas que pueden utilizarse como marcadores son de varios tipos: enzimas, sustancias fluorescentes, metales...

Para obtener un resultado fiable y exitoso con estas técnicas, no basta con realizar correctamente los diferentes pasos de la inmunotinción; además, es preciso que el tejido sobre el que estamos trabajando haya sido bien tratado, fijado y procesado.

Previo a la inmunotinción se ha realizado el desparafinado y desenmascaramiento antigénico de los anticuerpos.

El pretratamiento con calor se realizó mediante un sistema automatizado denominado *PT-Link* (Dako, Glostrup, Dinamarca), el cual consta de dos tanques, uno de ellos con una solución de recuperación antigénica Tris-EDTA, pH9 (Target Retrieval Solution, Dako), mientras el otro contiene como solución de recuperación antigénica tampón citrato, pH6 (Target Retrieval Solution, Dako) usando uno u otro dependiendo de las características del anticuerpo primario. Este sistema provocó el calentamiento de las muestras a 95°C durante 20 minutos, atemperándolas posteriormente hasta 65°C. Finalmente, las secciones se mantuvieron un mínimo de 5 minutos en tampón de lavado, en ambos casos.

Los cortes se introdujeron en las bandejas especiales del Auto-Stainer Dako (teñidor automático), donde se realizó la técnica de inmunohistoquímica.



**Figura 10:** *PT-link*



**Figura 11:** *Auto-Stainer Dako*

Los pasos que hemos seguido en nuestro estudio para la realización de esta técnica, han sido los siguientes: a) lavado en tampón; b) bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 min; c) incubación con anticuerpos primarios (tiempo dependiente del anticuerpo usado) (Tabla 7); d) lavado en tampón (Wash Buffer, Dako) para eliminar el exceso de anticuerpo; e) incubación de los cortes con el sistema de polímeros de dextrano durante 30 min (EnVision™ Detection Kit, Dako). El sistema de polímeros de dextrano se basa en la utilización de un polímero de alto peso molecular, al que se conjugan covalentemente un gran número de moléculas de peroxidasa y anticuerpo secundario (inmunoglobulinas anti-ratón/conejo); g) lavados con tampón; h) la visualización del marcaje inmunohistoquímico se realiza con tetraclorhidrato de diaminobencidina (DAB) (Dako) durante 7 min y 30 seg.; i) contratinción con hematoxilina de Harris durante 2 min.; j) las muestras se lavaron, se deshidrataron con alcoholes crecientes y xilol, y se montaron con la ayuda de un montador automático para posteriormente ser observadas al microscopio óptico Olympus BX51.

Se incluyeron controles negativos y positivos conocidos para asegurar la especificidad de la técnica.

El tiempo de incubación del anticuerpo primario, el pH de recuperación antigénica, la dilución del anticuerpo, la casa comercial, la utilización o no de linker, así como la temperatura a la que ha sido guardado, quedan relegados en la siguiente tabla.



**Tabla 7:** Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas mediante inmunohistoquímica.

Anticuerpo primario	Recuperación antigénica	Dilución del anticuerpo	Tiempo incubación	Referencia	Linker	Guardado
<b>IFN<math>\beta</math></b>	pH9	1:400	60´	T3236 EPITOMICS	NO	-20°C
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	pH9	1:600	60´	1546-1 EPITOMICS	NO	-20°C
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	pH6	1:400	120´	NB600-633 BIONOVA	NO	-20°C
<b>IL-6</b>	pH6	1:300	120´	H3569-B01P BIONOVA	SI	-20°C
<b>IL-10</b>	pH9	1:100	120´	MA1-82664 ThermoScientific	NO	4°C
<b>IL-17</b>	pH6	1:200	120´	251552 ABBIOTEC	NO	-20°C

#### **4. Análisis de la tinción tisular**

Se ha estudiado la localización de la inmunorreactividad en la muestra, el porcentaje de células teñidas y la intensidad de la tinción de las mismas, para cada anticuerpo. Se ha utilizado un sistema de análisis de imagen (figura 13) que consta de un microscopio (Olympus BX51) acoplado a una cámara fotográfica, y un programa adaptado (analySIS, Soft Imaging System, Münster, Alemania), para poder cuantificar el área teñida en cada caso.

En un principio, cada tinción fue teñida con el anticuerpo a estudio y contrastada con la tinción con hematoxilina, puesto que cada tipo de tinción tiene umbrales ópticos diferentes. Cada una de las dos muestras de cada paciente se analizó con un objetivo de 400X, estudiando dos áreas que fueron seleccionadas buscando las zonas que representaban tinción positiva para la proteína estudiada. El programa traza una línea alrededor de las áreas teñidas con el anticuerpo (áreas con mayor umbral óptico), quedando el resto de áreas sin teñir como un fondo azulado (tejido teñido con hematoxilina, con menor umbral óptico).

De la relación entre el área teñida, en amarillo, y el área no teñida por el anticuerpo, rosa, (tinción de núcleos) (Figura 14), se ha obtenido un porcentaje de área teñida de cada campo. Este porcentaje de área teñida para cada muestra fue la media de la obtenida en los dos campos analizados. Para cuantificar la intensidad de tinción se ha utilizado una escala numérica del cero al tres, reflejando el 0 la ausencia de tinción, el 1 una tinción débil, el 2 una tinción moderada, y el 3 una tinción intensa. Se ha calculado el valor de tinción; es decir, la expresión global o *score*, mediante una hoja de cálculo, multiplicando la intensidad de la misma por el porcentaje de área teñida.

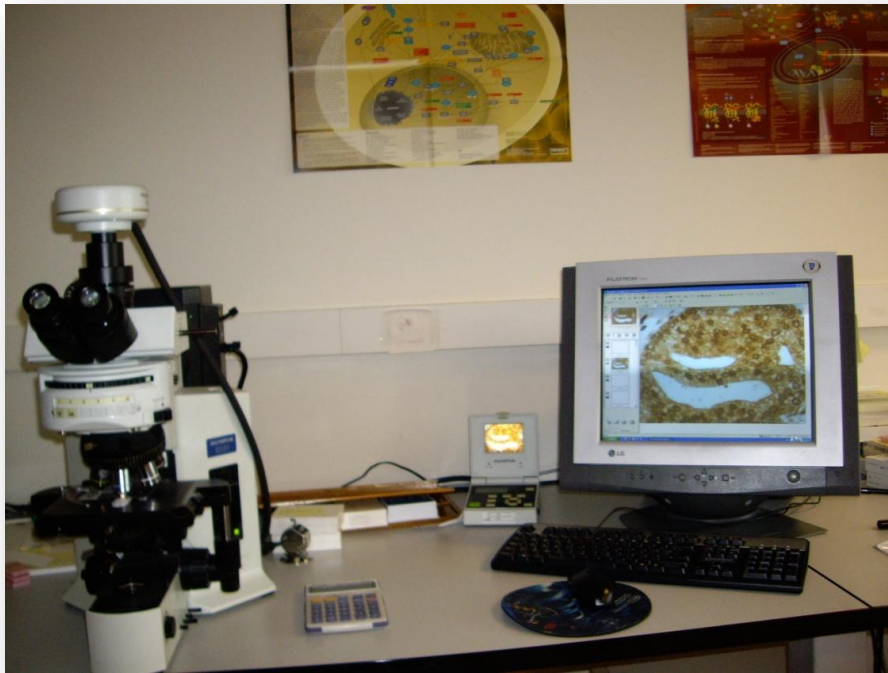


Figura 12: Sistema de análisis de imagen

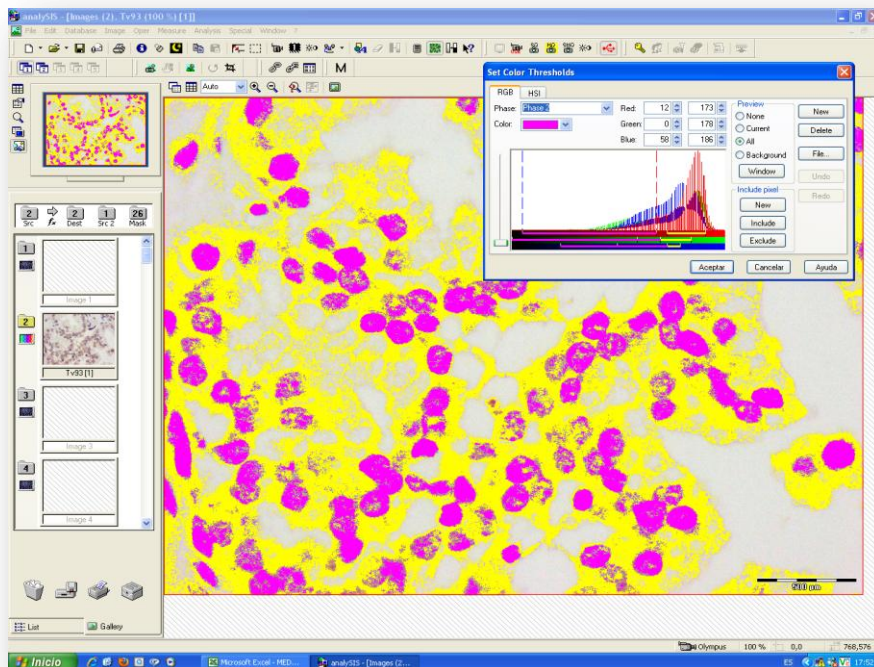


Figura 13: Sistema de tinción y análisis de imagen.

## **5. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos de las inmuno-tinciones, han sido analizados estadísticamente mediante el programa PASW statistics 18. Las diferencias en porcentajes fueron calculadas con la prueba del Chi-cuadrado. Los valores de tinción para cada proteína han sido expresados en forma de mediana, con un intervalo mínimo y máximo (rango). La comparación de los valores de tinción entre los grupos ha sido realizada con las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney o de Kruskal-Wallis para muestras independientes. La correlación entre la expresión de los factores a estudio y los niveles de PSA, ha sido llevada a cabo mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Por último, para la estimación de probabilidad de recurrencia bioquímica y el análisis de la supervivencia en pacientes con CaP, se ha utilizado el método no paramétrico de Kaplan-Meier.

Además, se ha utilizado el modelo de regresión de Cox con el fin de determinar las asociaciones de los diferentes factores pronósticos en un estudio multivariante.

Las diferencias entre grupos se consideraron significativas cuando el valor de p, fue igual o inferior a 0,05.

# Resultados

## 1. Casos perdidos

A lo largo de la realización de este estudio, en unos pocos casos, no hemos podido obtener resultados de las tinciones inmunohistoquímicas para los factores analizados. Ello ha sido debido a la ausencia de muestra tisular suficiente para realizar todas las determinaciones. A estos resultados los hemos denominado “casos perdidos”. Hemos de recordar que las muestras obtenidas para el estudio provenían de biopsias e intervenciones quirúrgicas, y no hemos podido tener acceso a todo el material necesario, puesto que ha sido utilizado por el Servicio de Anatomía Patológica para su correcto diagnóstico. En la tabla 8 se enumeran los casos perdidos para cada determinación.

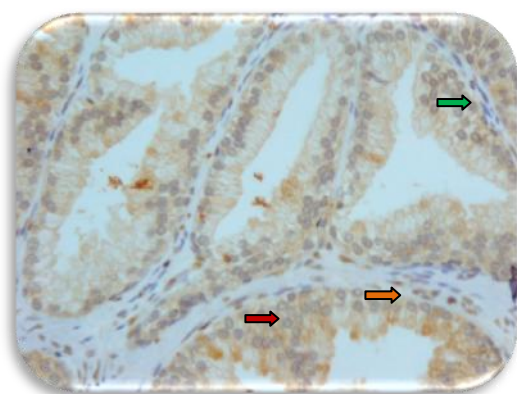
*Tabla 8: Casos perdidos del estudio.*

	<b>HBP</b>		<b>Cáncer Próstata</b>	
	Válidos	Perdidos	Válidos	Perdidos
<b>IFN<math>\beta</math></b>	50	6	118	6
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	50	7	118	5
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	50	9	118	5
<b>IL-6</b>	50	9	118	4
<b>IL-10</b>	50	24	118	52
<b>IL-17</b>	50	8	118	7

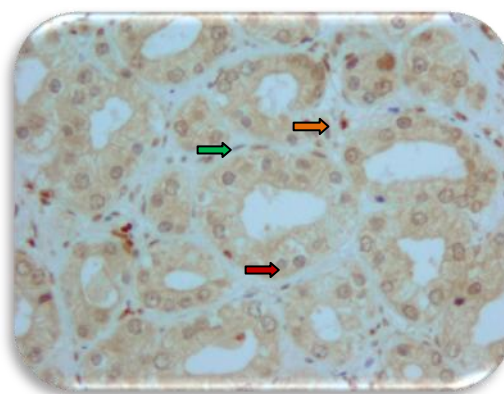
## **2. Expresión global de IFN $\beta$ , NF $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17 en la HBP y en el CaP**

Uno de los objetivos de este estudio ha sido determinar la expresión global (*score*) de los factores cuyo análisis hemos llevado a cabo, tanto en tejido hiperplásico prostático como en tejido tumoral. La figura 14 muestra algunos ejemplos de tejido de los arrays con la tinción inmunohistoquímica para cada proteína evaluada (IFN $\beta$ , NF $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17), tanto en pacientes con HBP como en pacientes con CaP. En estas imágenes apreciamos la expresión global, que aparece teñida en color marrón, de las células epiteliales (flecha roja), los fibroblastos (flecha verde) y las células mononucleares inflamatorias (MICs) (flecha naranja), en ambos grupos de pacientes. En azul observamos teñidos los núcleos de los distintos tipos celulares.

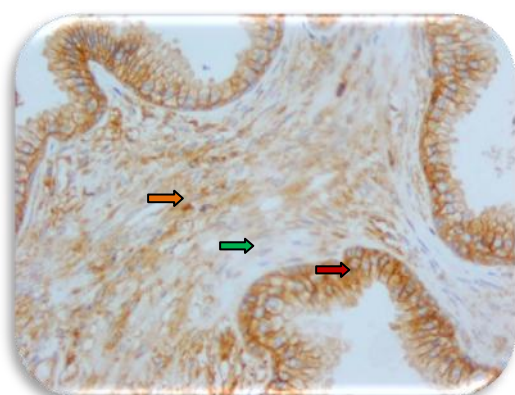
La inmunotinción para todas las proteínas estudiadas fue localizada tanto en las células tumorales como en las células estromales (fibroblastos y MICs) en la mayoría de los tumores.



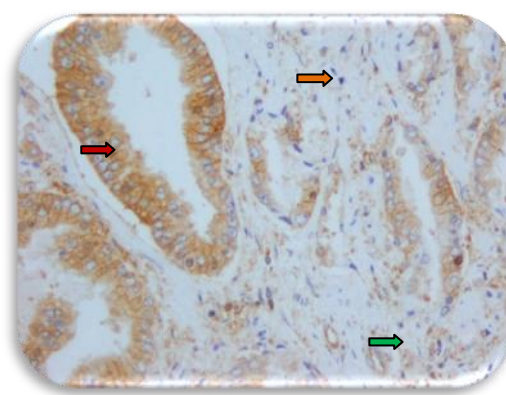
A) IFN $\beta$  en la HBP (200x)



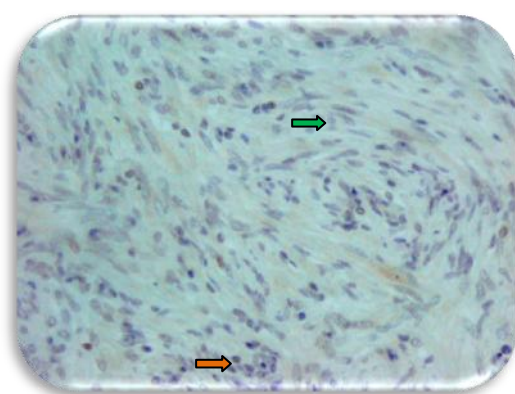
B) IFN $\beta$  en el CaP (200x)



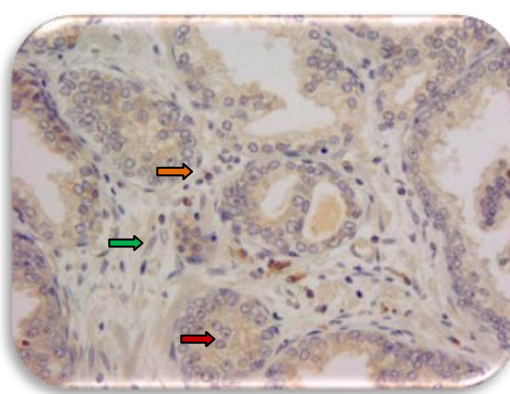
C) NF $\kappa$ B en la HBP (200x)



D) NF $\kappa$ B en el CaP (200x)



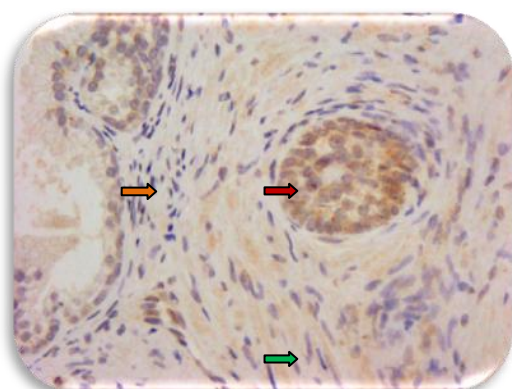
E) IL-1 $\beta$  en la HBP (200x)



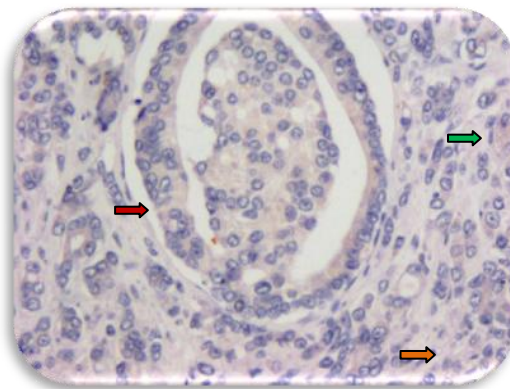
F) IL-1 $\beta$  en el CaP (200x)

**Figura 14:** Tinción de tejido prostático hiperplásico y tumoral para la IL-6 (G,H), IL-10 (I,J) e IL-17 (K,L). (→ Fibroblastos; → MICs; → Células epiteliales).

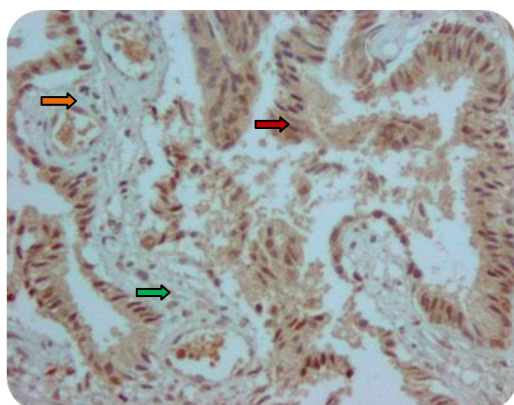




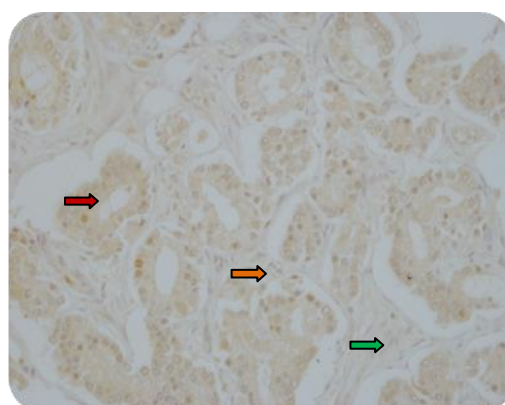
G) IL-6 en la HBP (200x)



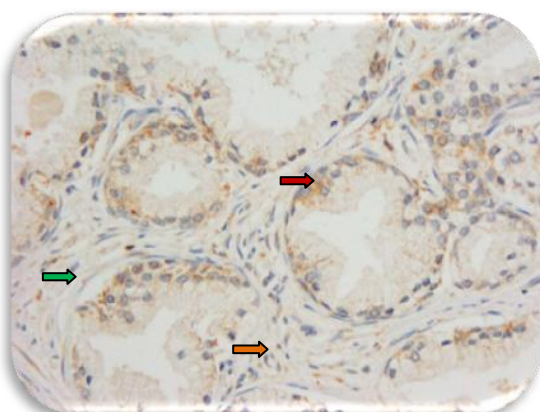
H) IL-6 en el CaP (200x)



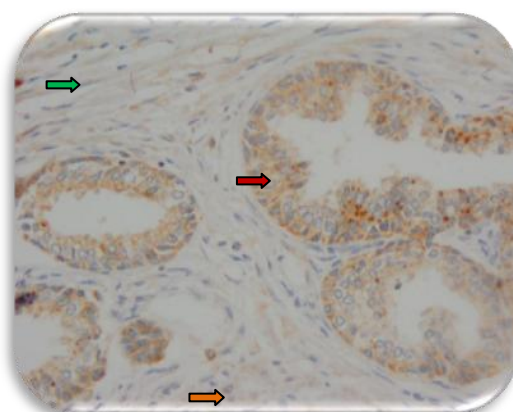
I) IL-10 en la HBP (200x)



J) IL-10 en el CaP (200x)



K) IL-17 en la HBP (200x)



L) IL-17 en el CaP (200x)

**Figura 14:** Tinción de tejido prostático hiperplásico y tumoral para la IL-6 (G,H), IL-10 (I,J) e IL-17 (K,L). (→ Fibroblastos; → MICs; → Células epiteliales).

En la Tabla 9, hemos recogido la expresión global de todos los factores a estudio en función de su mediana, describiendo también un intervalo mínimo y máximo de su expresión (rango). Nuestros resultados muestran una variabilidad de las expresiones de los diferentes factores, tanto en las muestras procedentes de HBP como en los carcinomas prostáticos.

No hemos encontrado diferencias significativas de las expresiones de IFN $\beta$  y de NFkB entre hiperplasia y los carcinomas. Sin embargo, los valores de IL-6 fueron significativamente más elevados en HBP que en carcinoma prostático ( $p= 0,001$ ). Por el contrario, los valores de IL-1 $\beta$  e IL-17 fueron significativamente más elevados en los carcinomas prostáticos que en el tejido hiperplásico ( $p < 0,0001$  y  $p= 0,035$ ; respectivamente).

**Tabla 9:** Expresión global de IFN $\beta$ , NFkB, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17 en la hiperplasia prostática benigna y en los carcinomas prostáticos.

	HBP			Cáncer Próstata			Valor de p
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
<b>IFN<math>\beta</math></b>	254,01	151,9	285,06	239,53	8,37	291,06	0,228
<b>NFkB</b>	254,58	166,52	279,99	256,17	76,14	294,21	0,959
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	103,98	43,58	159,58	151,08	63,90	177,54	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>IL-6</b>	149,36	53,03	248,58	90,49	0	253,62	<b>0,001</b>
<b>IL-10</b>	179,60	134,68	280,95	176,39	75,14	285,54	0,124
<b>IL-17</b>	157,49	69,13	273,09	180,58	62,09	283,20	<b>0,035</b>

### **3. Expresión de IFN $\beta$ , NF $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17 por los distintos tipos celulares**

Otro objetivo de nuestro estudio, ha sido evaluar el porcentaje de expresión de los diferentes factores en función del tipo celular; es decir, la expresión de cada uno de ellos por las células epiteliales (hiperplásicas o tumorales), como estromales (fibroblastos y CMI); tanto en el tejido hiperplásico prostático como en el tumoral.

Como podemos observar en la tabla 10, la inmunotinción para todas las proteínas estudiadas se ha localizado tanto en las células tumorales como en las estromales, no pudiendo establecerse en ningún caso diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la expresión por tipo celular.

**Tabla 10:** Expresión de *IFN $\beta$* , *NF $\kappa$ B*, *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-10* e *IL-17* por las células epiteliales, los fibroblastos y las células mononucleares inflamatorias (C.M.I.).

	HBP			Cáncer Próstata		
	C. Epitelial N° (%)	Fibroblasto N° (%)	C.M.I. N° (%)	C. Tumoral N° (%)	Fibroblasto N° (%)	C.M.I. N° (%)
<b>IFN<math>\beta</math></b>	44 (100)	44 (100)	43 (97,7)	109 (97,3)	110 (98,2)	108 (97,3)
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	43 (100)	43 (100)	43 (100)	111 (100)	106 (95,5)	106 (95,5)
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	41 (100)	41 (100)	39 (95,1)	113 (100)	108 (95,6)	108 (95,6)
<b>IL-6</b>	41 (100)	41 (100)	41 (100)	112 (98,2)	108 (94,7)	112 (98,2)
<b>IL-10</b>	23 (100)	23 (100)	23 (100)	66 (100)	66 (100)	66 (100)
<b>IL-17</b>	42 (100)	42 (100)	42 (100)	111 (100)	111 (100)	111 (100)

#### **4. Correlaciones entre las expresiones de IFN $\beta$ , NF $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17.**

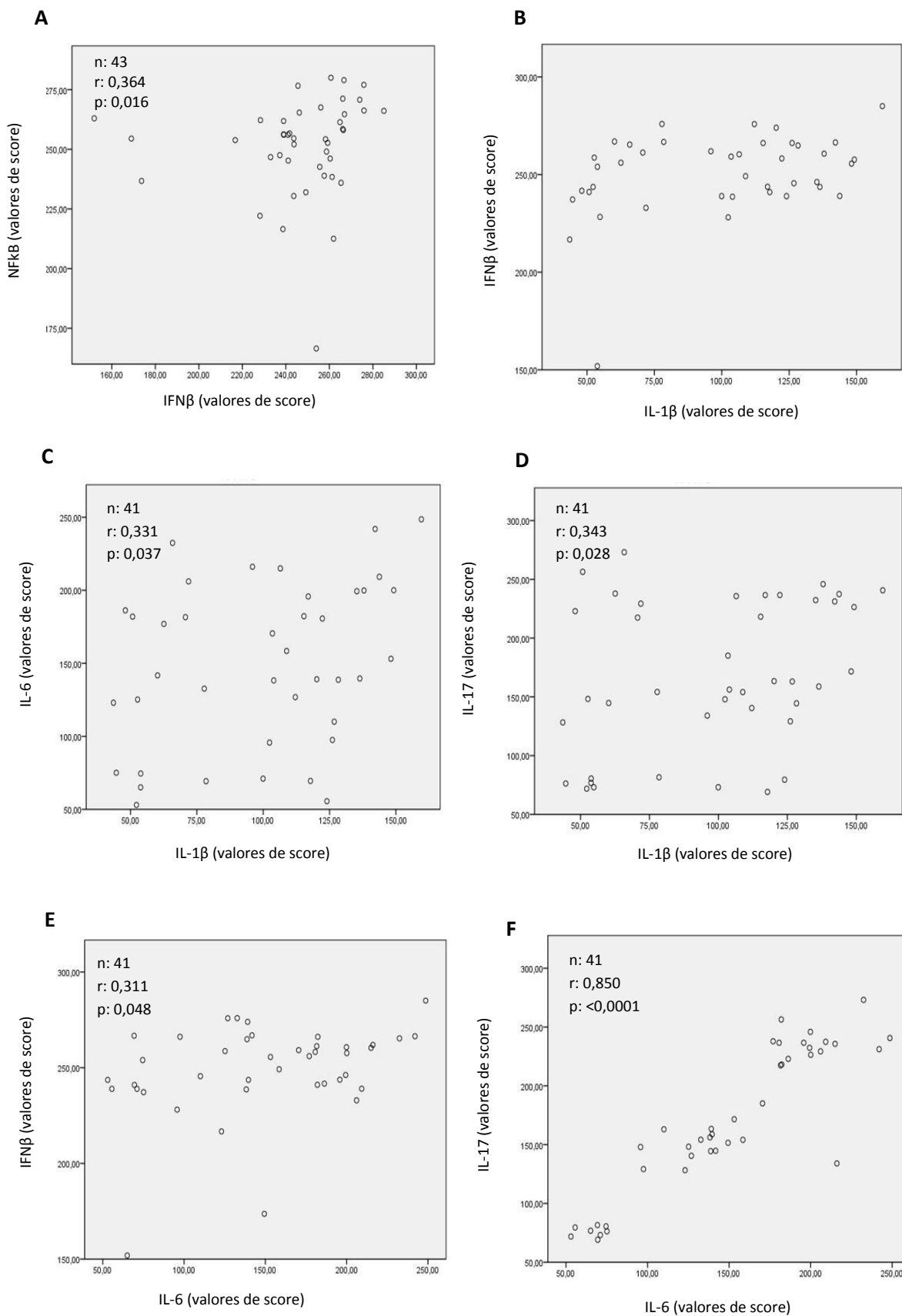
Como se muestra en las tablas 11 y 12, hemos analizado las posibles correlaciones entre todos los factores a estudio (IFN $\beta$ , NF $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17), tanto en el tejido hiperplásico prostático como en los carcinomas prostáticos. Para ello, hemos utilizado el test no paramétrico de la correlación de Spearman.

Hemos encontrado diversas correlaciones significativas entre las proteínas; tanto en la HBP como en el cáncer prostático. En la HBP (Tabla 11) nuestros resultados muestran una correlación significativamente positiva entre la expresión del IFN $\beta$  y el NF $\kappa$ B ( $p= 0,016$ ). También existe una correlación significativamente positiva entre los valores de score de la tinción para la IL-1 $\beta$  y el IFN $\beta$  ( $p= 0,044$ ); así como con la IL-6 ( $p= 0,037$ ) y con la IL-17 ( $p= 0,028$ ). Por otra parte, la expresión de la IL-6 también se relaciona positivamente con la expresión del IFN $\beta$  ( $p=0,048$ ), así como con la expresión de la IL-17 ( $p< 0,0001$ ).

**Tabla 11:** Correlaciones de la expresión simultánea de los factores a estudio en la HBP.

		HBP					
		IFN $\beta$	NF $\kappa$ B	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-10	IL-17
IFN $\beta$			r: 0,364 <b>p: 0,016</b>	r: 0,316 <b>p: 0,044</b>	r: 0,311 <b>p: 0,048</b>	N. S.	N. S.
NF $\kappa$ B	r: 0,364 <b>p: 0,016</b>			N. S.	N. S.	N. S.	N. S.
IL-1 $\beta$	r: 0,316 <b>p: 0,044</b>	N. S.			r: 0,331 <b>p: 0,037</b>	N. S.	r: 0,343 <b>p: 0,028</b>
IL-6	r: 0,311 <b>p: 0,048</b>	N. S.		r: 0,331 <b>p: 0,037</b>		N. S.	r: 0,850 <b>p&lt;0,0001</b>
IL-10	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.			N. S.
IL-17	N. S.	N. S.	r: 0,343 <b>p: 0,028</b>	r: 0,850 <b>p&lt;0,0001</b>		N. S.	

Abreviaturas: HBP= hiperplasia benigna prostática, IL= interleuquina, N. S.= No significativo



**Figura 15:** Relación de las expresiones significativamente positivas de los factores a estudio en HBP.

En cuanto al carcinoma prostático (Tabla 12), nuestros resultados muestran una correlación significativamente positiva entre la expresión del IFN $\beta$  y la de NFkB ( $p= 0,001$ ). Los valores de score para la IL-1 $\beta$  también se relacionan, al igual que en la HBP, con la IL-6 ( $p= 0,004$ ) y con la IL-17 ( $p=0,021$ ).

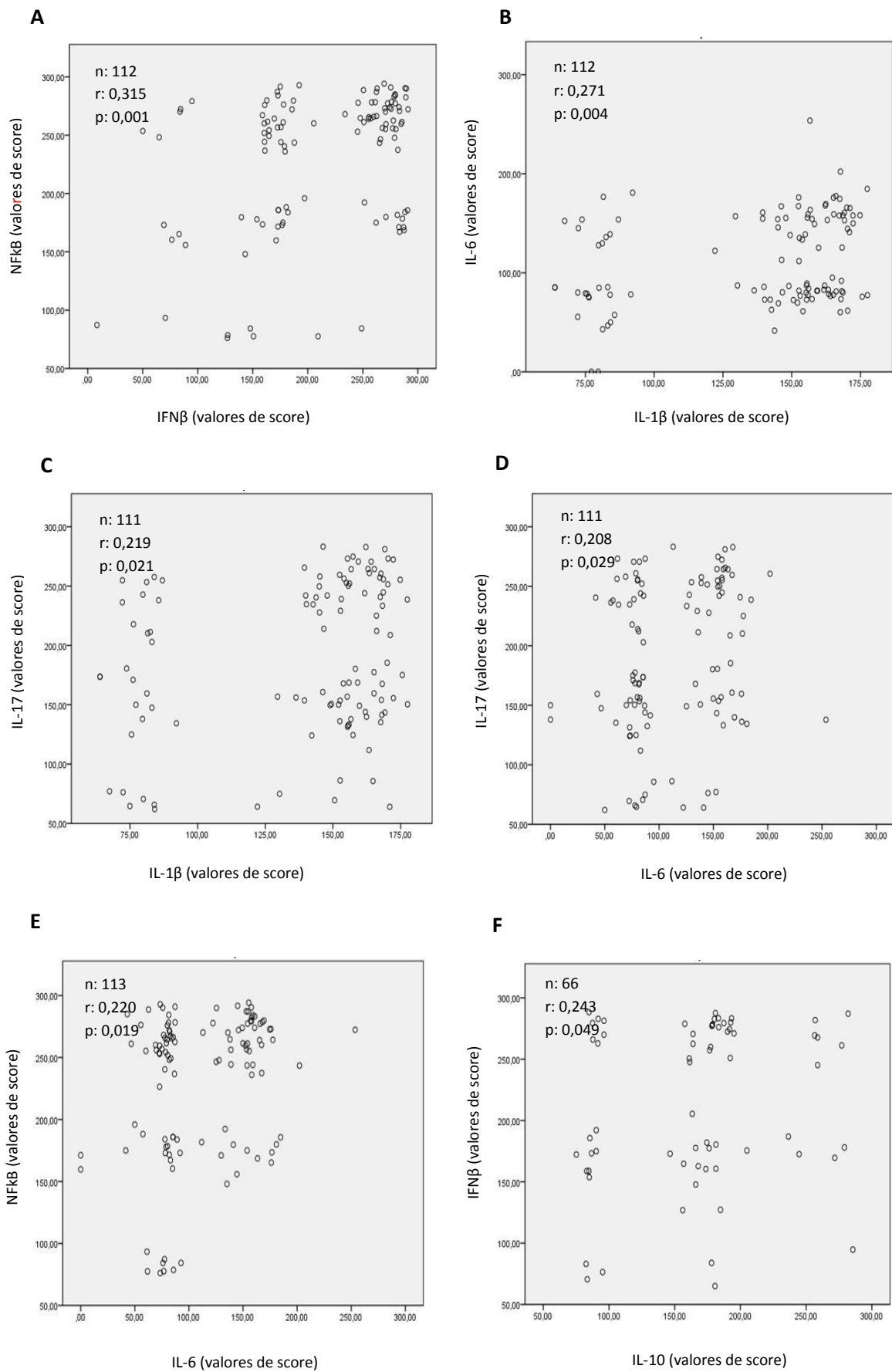
Otra correlación significativamente positiva entre citoquinas, al igual que en HBP, ha sido la IL-6 e IL-17 ( $p= 0,029$ ). Sin embargo, en contra de lo sucedido en HBP, sí se ha podido establecer una relación entre el NFkB y la IL-6 ( $p= 0,019$ ); así como que la IL-10 en CaP se relaciona de forma significativa y positiva con la de IFN $\beta$  y con la de IL-17 ( $p= 0,049$  y  $p= 0,002$ , respectivamente).

**Tabla 12:** Correlaciones de la expresión simultánea de los factores a estudio en el CaP.

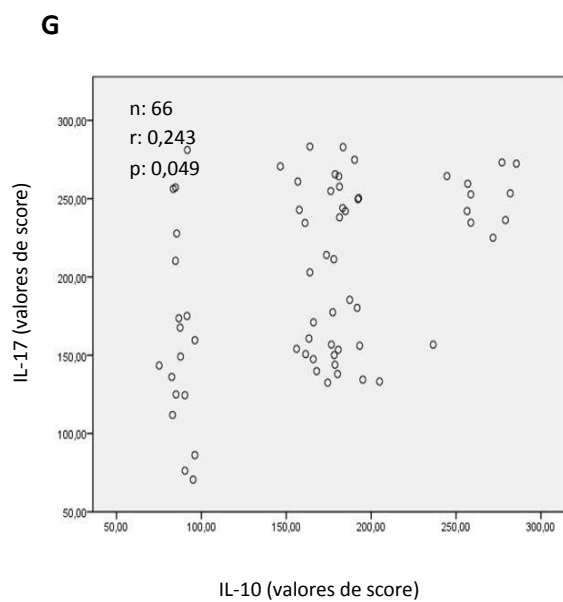
		Carcinoma prostático					
		IFN $\beta$	NFkB	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-10	IL-17
IFN $\beta$			r: 0,315 <b>p: 0,001</b>	N. S.	N. S.	r: 0,243 <b>p: 0,049</b>	N. S.
NFkB	r: 0,315 <b>p: 0,001</b>			N. S.	r: 0,220 <b>p: 0,019</b>	N. S.	N. S.
IL-1 $\beta$	N. S.	N. S.			r: 0,271 <b>p: 0,004</b>	N. S.	r: 0,219 <b>p: 0,021</b>
IL-6	N. S.	r: 0,220 <b>p: 0,019</b>	r: 0,271 <b>p: 0,004</b>			N. S.	r: 0,208 <b>p: 0,029</b>
IL-10	r: 0,243 <b>p: 0,049</b>	N. S.	N. S.	N. S.			r: 0,371 <b>p: 0,002</b>
IL-17	N. S.	N. S.	r: 0,219 <b>p: 0,021</b>	r: 0,208 <b>p: 0,029</b>	r: 0,371 <b>p: 0,002</b>		

Abreviaturas: IL= interleuquina, N. S.= No significativo





**Figura 16:** Relación de las expresiones significativamente positivas de los factores a estudio en el CaP.



**Figura 16:** *Relación de las expresiones significativamente positivas de los factores a estudio en el CaP.*

## **5. Relación de la expresión de los factores con las características clínico-patológicas de los pacientes**

También hemos evaluado la posible relación entre la expresión del IFN $\beta$ , NF $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17, y las diferentes características clínico-patológicas de los pacientes, tanto en HBP (tabla 13) como en el carcinoma prostático (tabla 14). Entre las características clínico-patológicas hemos incluido factores como la edad de los pacientes, estadio tumoral, grado histológico, localización tumoral y los niveles de PSA previo al tratamiento.

Para la determinación de la relación entre la distribución del score de los factores y la mediana de la edad de los pacientes, así como con el estadio y localización tumoral y los niveles de PSA previos, hemos utilizado la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes. Sin embargo, para la determinación de la relación entre el score de los factores y el score de Gleason tumoral, hemos utilizado la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes.

Como se puede observar en la tabla 13 y 14 nuestros resultados no muestran diferencias significativas en los valores de score para cada proteína, en correlación con las diferencias clínico-patológicas de los pacientes como la edad, estadio tumoral, score Gleason o niveles séricos de PSA. Únicamente hemos encontrado una asociación significativa entre los valores de score de la IL-1 $\beta$  y la localización tumoral; siendo la localización bilateral; es decir, en ambos lóbulos prostáticos simultáneamente, la que muestra unos mayores valores de proteína ( $p= 0,041$ ).

**Tabla 13:** Relación entre la expresión de las citoquinas a estudio y las características clinicopatológicas en los pacientes con hiperplasia benigna prostática.

Características	n	IFN $\beta$		NF $\kappa$ B		IL-1 $\beta$		IL-6		IL-10		IL-17	
		Mediana (intervalo)	<i>p</i>	Mediana (intervalo)	<i>p</i>	Mediana (intervalo)	<i>p</i>	Mediana (intervalo)	<i>p</i>	Mediana (intervalo)	<i>p</i>	Mediana (intervalo)	<i>p</i>
<b>Edad (años)</b>			0,860		0,752		0,835		0,389		0,389		0,212
≤ 68	23	254 (151,9-285,1)		254,4 (212,5-277)		105,2 (43,6-159,6)		138,9 (53-248,6)		180,7 (134,7-269,5)		152,1 (69,1-240,7)	
> 68	24	253,9 (168,9-275,9)		256,1 (166,5-279,9)		99,9 (50,8-149,2)		158,5 (55-241,9)		176,3 (159,7-280,9)		167,3 (73,1-273,1)	
<b>PSA previo</b>			0,111		0,900		0,135		0,099		0,411		0,075
≤ 10ng/ml	42	255,8 (151,9-285,1)		254,6 (212,5-279,9)		106,5 (44,65-159,6)		155,8 (53-248,6)		179,7 (134,7-280,9)		161,1 (69,1-273,1)	
> 10 ng/ml	5	236,9 (216,7-253,9)		258 (166,5-276,6)		54,4 (43,58-126,8)		110 (74,6-123)		170,9 (165,2-188,4)		104,4 (73,1-163,1)	

**Tabla 14:** Relación entre la expresión de las citoquinas a estudio y las características clinicopatológicas en los pacientes con carcinoma prostático.

Características	n	IFN $\beta$		NF $\kappa$ B		IL-1 $\beta$		IL-6		IL-10		IL-17	
		Mediana (intervalo)	P	Mediana (intervalo)	P	Mediana (intervalo)	P	Mediana (intervalo)	P	Mediana (intervalo)	P	Mediana (intervalo)	P
<b>Edad (años)</b>			0,068		0,756		0,767		0,807		0,243		0,862
≤ 67	61	182 (8,4-289,6)		253,3 (77,5-294,2)		152,6 (72,2-177,5)		117,6 (55,6-253,62)		166 (75,1-285,5)		195 (63,9-283,2)	
> 67	57	261,2 (70,6-291,1)		260,2 (76,1-290,9)		154,9 (63,9-177,5)		86,4 (0-202,1)		187,7 (83-281,9)		180 (62,1-282,9)	
<b>Estadío Tumoral</b>			0,545		0,889		0,893		0,734		0,212		0,104
T1-T2	96	247,7 (8,4-291,1)		255,62 (76,14-294,2)		153,6 (63,9-177,5)		89,1 (0-253,6)		178 (75,1-285,5)		182,9 (63,9-282,9)	
T3-T4	22	185,7 (50,1-290,6)		261,3 (155,9-279,8)		150,6 (72,2-177,5)		91,9 (49,9-184,7)		163,9 (83-279,1)		180 (62,1-283,2)	
<b>Score Gleason</b>			0,169		0,149		0,641		0,392		0,273		0,182
2-4	14	190,2 (65-288,3)		214,2 (78,6-291,7)		146,2 (72,4-175,6)		89,23 (0-167,1)		171,8 (75-244,6)		153,5 (65,8-264,4)	
5-6	64	187,4 (8,4-291,1)		259,7 (76,1-292,9)		149,4 (63,9-177,5)		88,12 (41,6-253,6)		176,2 (83-285,5)		180,6 (62,1-283,2)	
7-10	40	257,6 (50,1-290,6)		258,2 (155,9-294,2)		158,3 (75-177,5)		108,6 (46,7-202,1)		176,6 (84-277)		217,8 (64,7-282,9)	
<b>Localización Tumoral</b>			0,157		0,297		<b>0,041</b>		0,209		0,305		0,872
Unilateral	93	248,3 (50,1-290,6)		258,2 (77,5-294,2)		152,27 (63,9-177,5)		112,9 (41,6-253,6)		177 (75,1-285,5)		185,4 (62,1-283,2)	
Bilateral	24	176,7 (8,4-291,1)		247,4 (76,1-290,4)		161,6 (63,9-177,6)		82,4 (0-177,1)		156,8 (83-277,1)		173,6 (64-274,8)	
<b>PSA previo</b>			0,077		0,462		0,434		0,248		0,171		0,498
≤ 10ng/ml	83	250,9 (8,4-291,1)		258,2 (77,5-293,2)		153,8 (63,9-177,5)		117,6 (0-253,6)		177,4 (75-285,5)		208,7 (64-283,2)	
> 10 ng/ml	35	178,9 (50,1-288,4)		253 (76,1-292,9)		152,8 (63,9-175,6)		85,1 (0-176,7)		163 (83,5-258,7)		174,3 (62,1-282,9)	

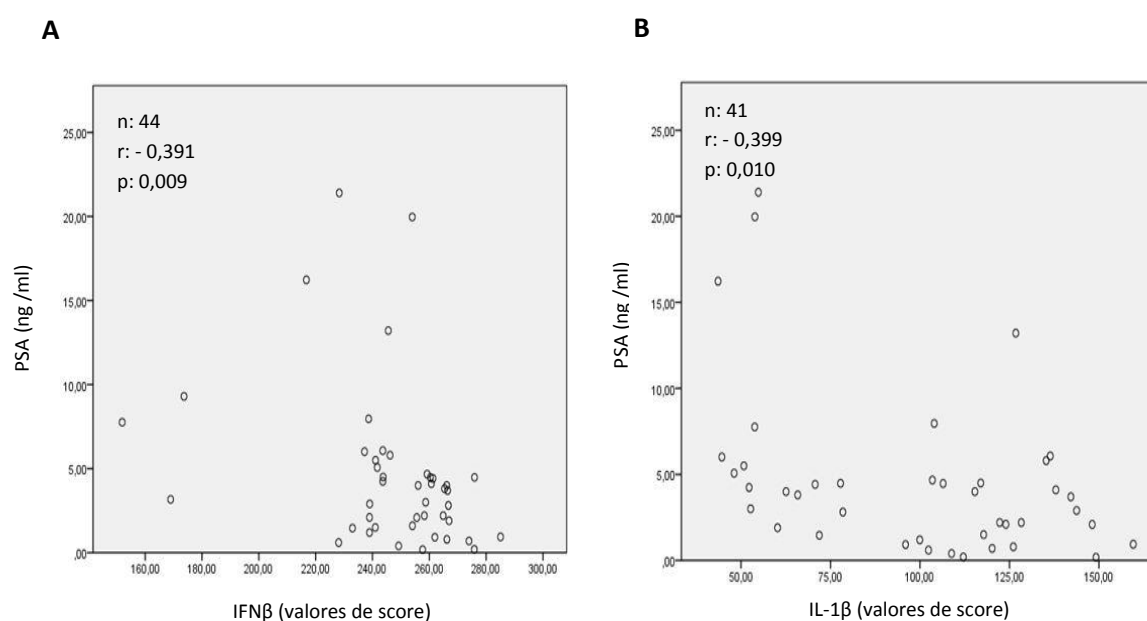
## 6. Correlación entre los niveles séricos pretratamiento de PSA y los diferentes factores en HBP y Cáncer de próstata

En el tejido prostático hiperplásico analizado, los resultados muestran una correlación significativamente negativa, entre la expresión de IFN $\beta$  e IL-1 $\beta$ , y los niveles de PSA previo ( $p= 0,009$  y  $p= 0,01$ , respectivamente) (Tabla 15, Figura 17 A,B). Sin embargo, no se ha podido establecer ninguna significación entre la expresión de NF $\kappa$ B, IL-6, IL-10 e IL-17 con los niveles previos de PSA en HBP (tabla 15).

**Tabla 15:** Correlación de los niveles de expresión de IFN $\beta$ , NF $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17 con los niveles séricos de PSA previo en HBP.

	IFN $\beta$	NF $\kappa$ B	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-10	IL-17
PSA previo (ng/ml)	r: -0,391 p: <b>0,009</b>	N. S.	r: -0,399 p: <b>0,010</b>	N. S.	N. S.	N. S.

Abreviaturas: PSA= antígeno prostático específico, IL= interleuquina, N. S.= No significativo



**Figura 17:** Correlaciones significativas de los niveles de expresión del IFN $\beta$  (A), IL-1 $\beta$  (B), con los niveles de PSA previo en HBP.

En cuanto a los valores analizados en los carcinomas prostáticos, nuestros resultados no muestran ninguna correlación significativa entre la expresión de los factores a estudio y los niveles de PSA previo a la intervención (Tabla 16).

**Tabla 16:** Correlación de los niveles de expresión de *IFN $\beta$* , *NF $\kappa$ B*, *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-10* e *IL-17* con los niveles séricos de PSA previo en CaP.

	<b>IFN<math>\beta</math></b>	<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-10</b>	<b>IL-17</b>
<b>PSA previo</b> (ng/ml)	N.S.	N. S.	N.S.	N. S.	N. S.	N. S.

Abreviaturas: PSA= antígeno prostático específico, IL= interleuquina, N. S.= No significativo

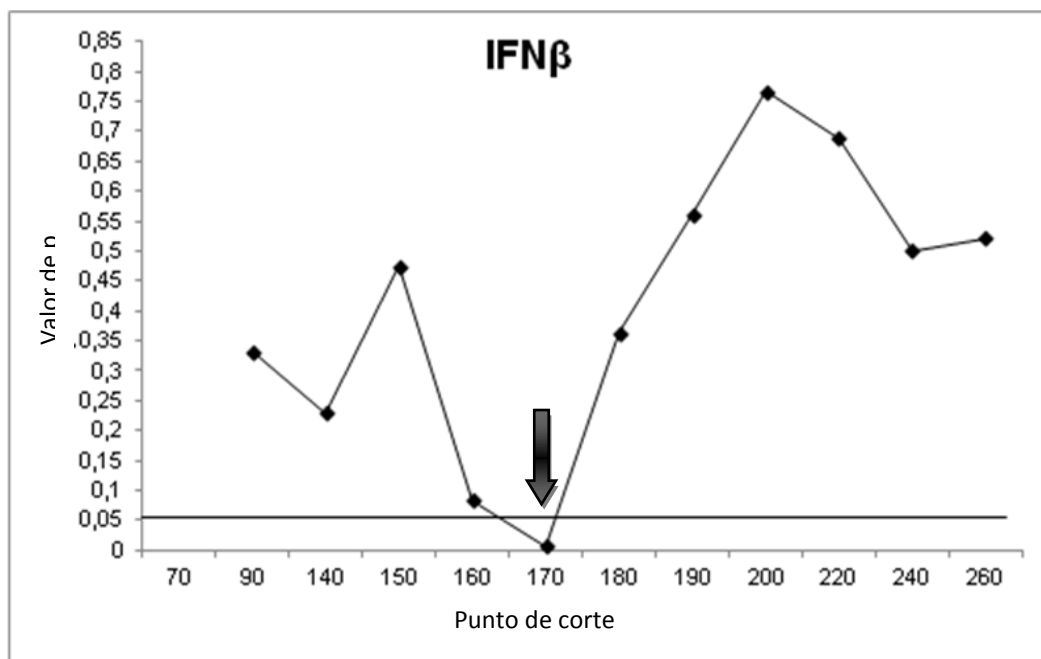
## **7. Relación de la expresión de los factores a estudio con la recurrencia bioquímica en los pacientes con cáncer de próstata**

La asociación potencial entre los valores de expresión de los diferentes factores y la recurrencia bioquímica ha sido evaluada en todos los pacientes incluidos en el presente estudio. El análisis estadístico no mostró asociaciones significativas entre las expresiones de IFN $\beta$ , NF $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17, y la recurrencia bioquímica. Sin embargo, los valores de expresión más altos de la IL-1 $\beta$  fueron significativamente y positivamente asociados con la recurrencia bioquímica. Por el contrario, los valores de expresión más altos de IFN $\beta$ , fueron relacionados significativamente y negativamente con la recurrencia bioquímica.

El análisis de los posibles puntos de corte de los valores de score, nos ha llevado a definir un valor de expresión de 160 para la IL-1 $\beta$  y de 170 para el IFN $\beta$ , ya que se consideran los puntos de corte óptimos [ $\chi^2=5,38$  (p= 0,020) y  $\chi^2= 7,08$  (p= 0,008), respectivamente] (Figura 18 y 19); y que han identificado a 37 pacientes (32,7%) y 30 pacientes (26,8%), respectivamente, con alta probabilidad de recurrencia bioquímica.



A



B

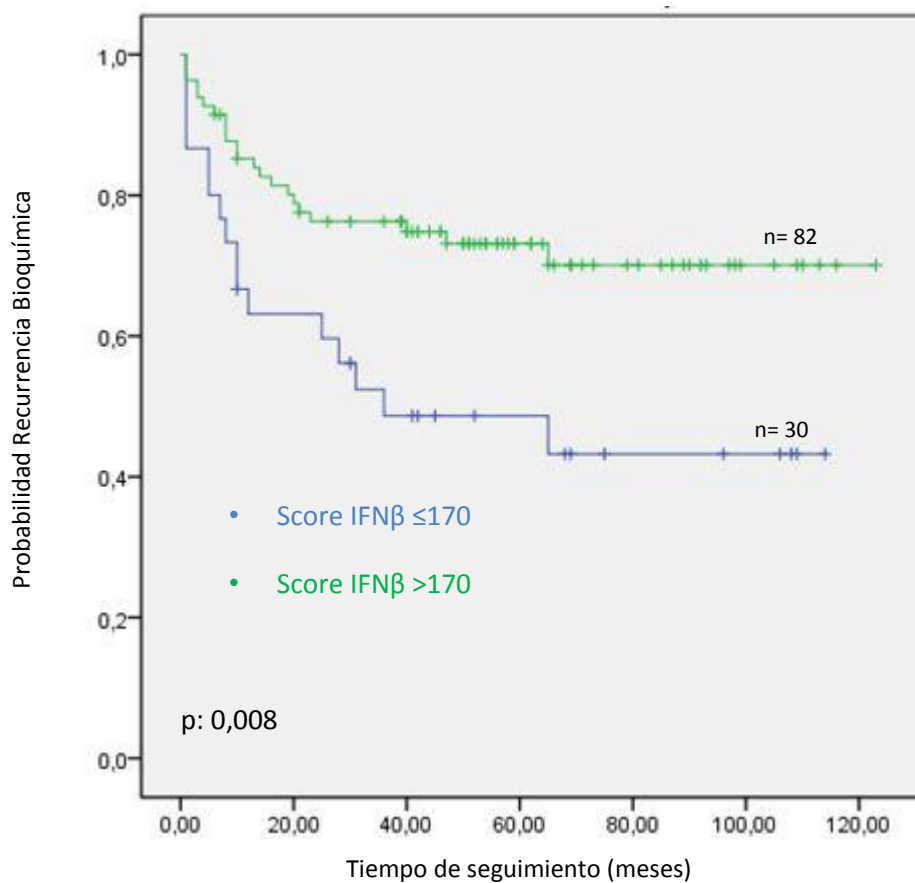
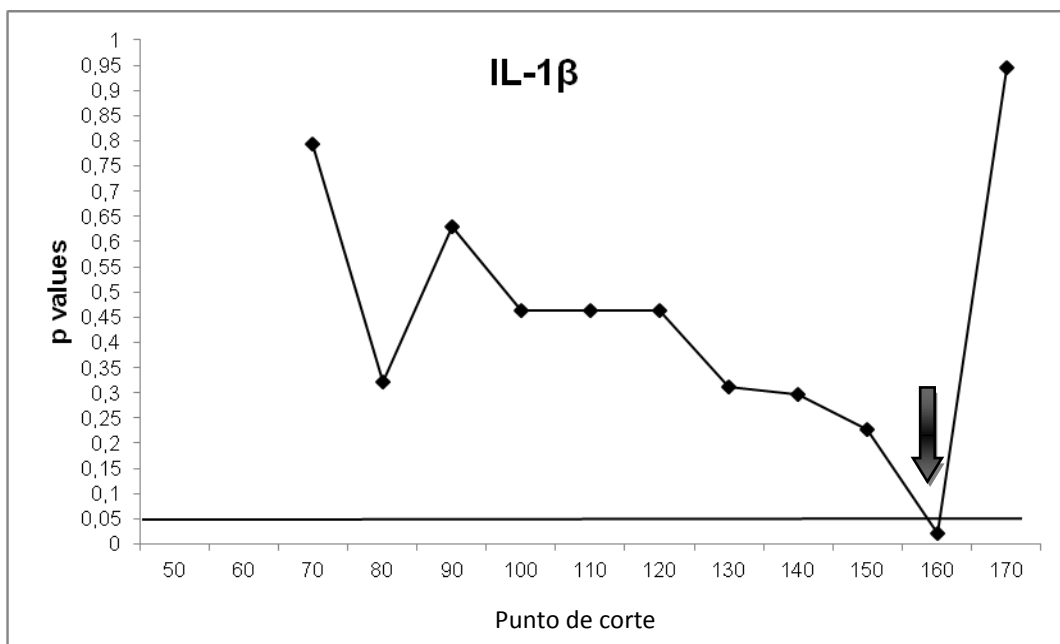


Figura 18: Curva de cutoff de IFN $\beta$  (A) y la probabilidad de recurrencia bioquímica (B).

C



D

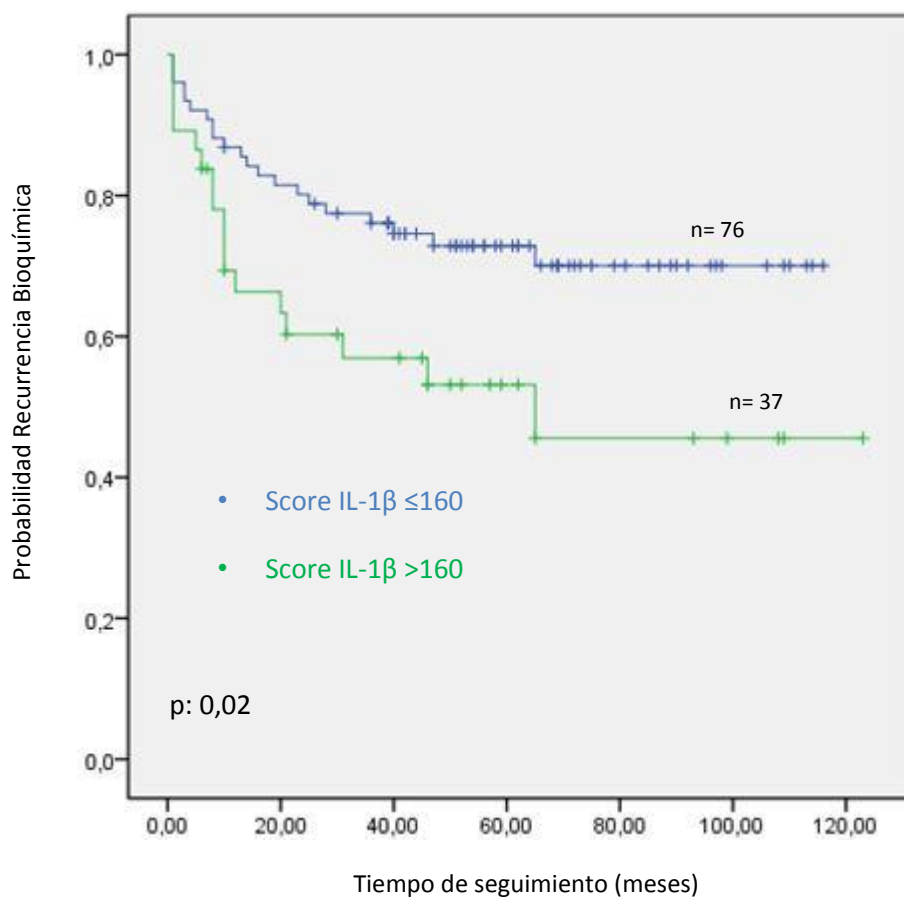
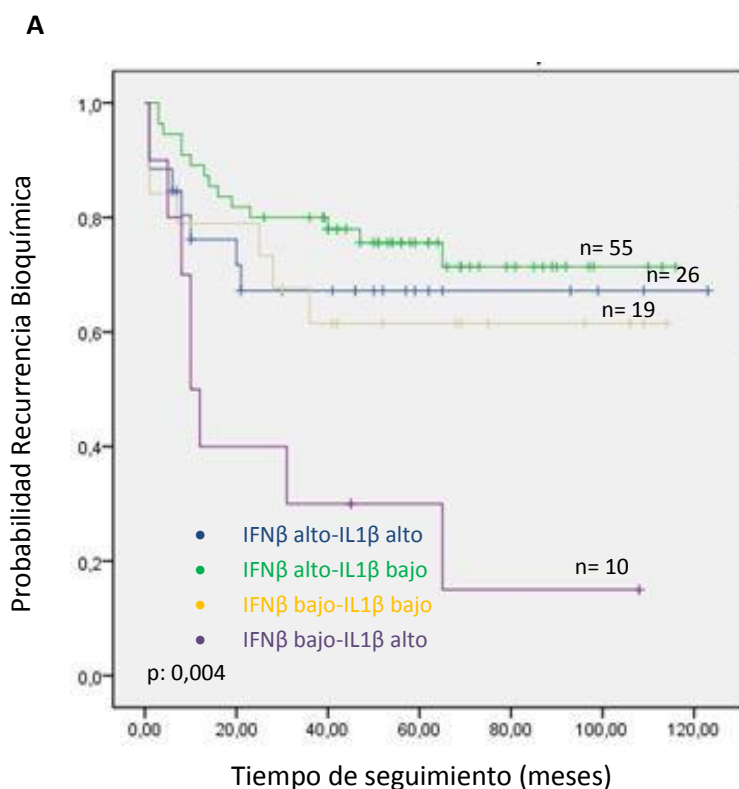


Figura 19: Curva de cutoff de IL-1β (C) y la probabilidad de recurrencia bioquímica (D).

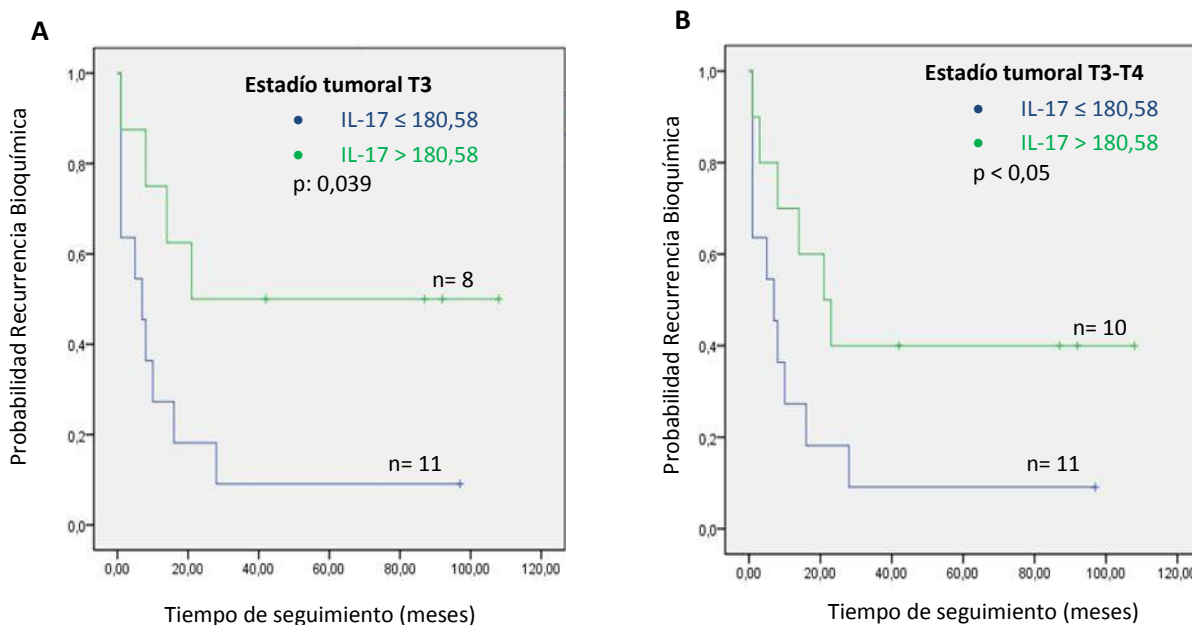
Ha resultado importante el hallazgo que indica que la combinación simultánea en la expresión del IFN $\beta$  y la IL-1 $\beta$  es capaz de identificar a un subgrupo de pacientes con una elevada probabilidad de recurrencia bioquímica postoperatoria. Así, nuestros resultados muestran que una menor expresión de IFN $\beta$  acompañada de una mayor expresión de IL-1 $\beta$ , tiene una alta probabilidad de recurrencia bioquímica ( $p= 0,004$ ) identificando, aproximadamente, a un 10% de pacientes de alto riesgo (Figura 20). Por el contrario, los pacientes cuyos tumores muestran altos valores de IFN $\beta$  y bajos de IL-1 $\beta$ , fueron los que tuvieron un mejor pronóstico.



**Figura 20:** Curvas de probabilidad de recurrencia bioquímica en función de la expresión simultánea de ambos factores (IFN $\beta$  e IL-1 $\beta$ ).

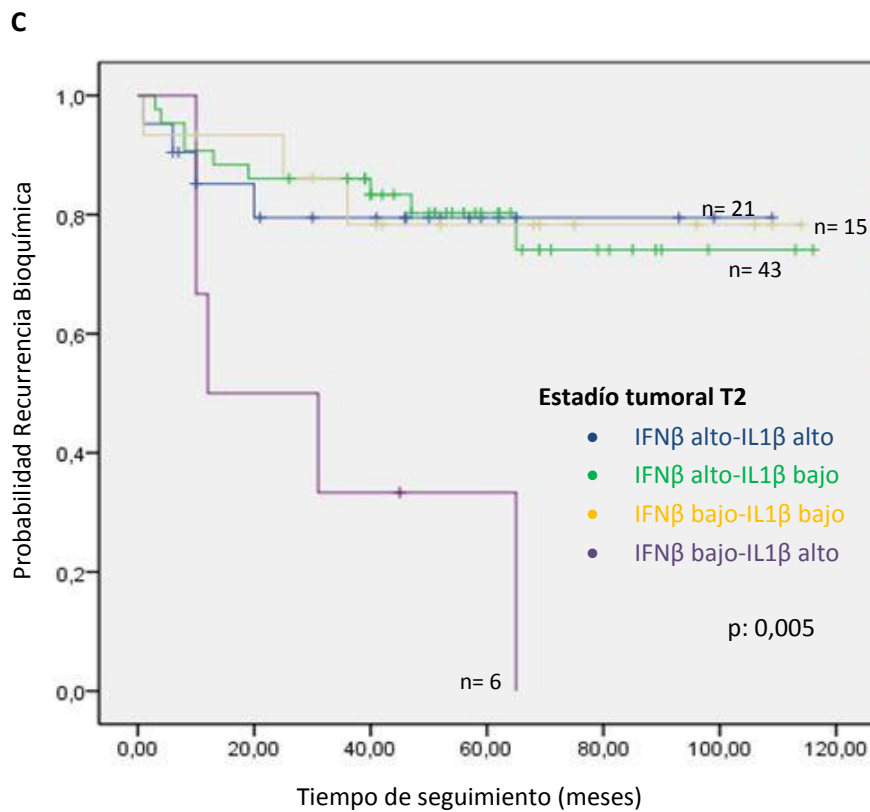
Asimismo, nuestro estudio estadístico también muestra que una mayor expresión de la IL-17 se asocia positiva y significativamente en el estadio tumoral T3 con un mayor riesgo de

recurrencia bioquímica postoperatoria ( $p= 0,039$ ) (Figura 21 A). Además, la mayor expresión de la IL-17 se sigue asociando con un peor pronóstico de la enfermedad en aquellos pacientes con estadio tumoral T3-T4 ( $p < 0,05$ ) (Figura 21 B).



**Figura 21:** Curvas de probabilidad de recurrencia bioquímica en función de la mediana del score de la IL-17 en el carcinoma prostático estadio T3 (A) y T3-T4 (B).

También hemos determinado las curvas de recurrencia bioquímica en pacientes con carcinoma prostático en función del estadio tumoral, de acuerdo a los puntos de corte óptimos establecidos para el IFN $\beta$  y para la IL-1 $\beta$ . Así, como se muestra en la figura 22, la expresión de la combinación de bajos niveles de IFN $\beta$  y la expresión simultánea de altos niveles de IL-1 $\beta$ , muestra una asociación significativa en cuanto a la probabilidad de recurrencia bioquímica en el estadio tumoral T2 ( $p= 0,005$ ). Es decir, la expresión de esta combinación de factores, nos podría ayudar a identificar a un número determinado de pacientes dentro del estadio tumoral T2, con un alto riesgo de recurrencia bioquímica, a pesar de su temprano estadio tumoral.



**Figura 22:** Curvas de probabilidad de recurrencia bioquímica en función de la expresión simultánea de ambos factores en el carcinoma prostático estadio tumoral T2.

Otro resultado importante que muestra nuestro estudio, es que una alta expresión de IL-1 $\beta$  se asocia significativamente con mal pronóstico en aquellos pacientes que tienen tumores prostáticos con un grado Gleason 5-6 ( $p= 0,024$ ) (Figura 23 A); mientras que una elevada expresión del IFN $\beta$  se asoció significativamente con una evolución más favorable en pacientes con tumores prostáticos con un grado Gleason 7-10 ( $p= 0,036$ ) (Figura 23 B); lo que podría contribuir a una mayor exactitud de la evaluación pronóstica en pacientes sometidos a prostatectomía radical.

A

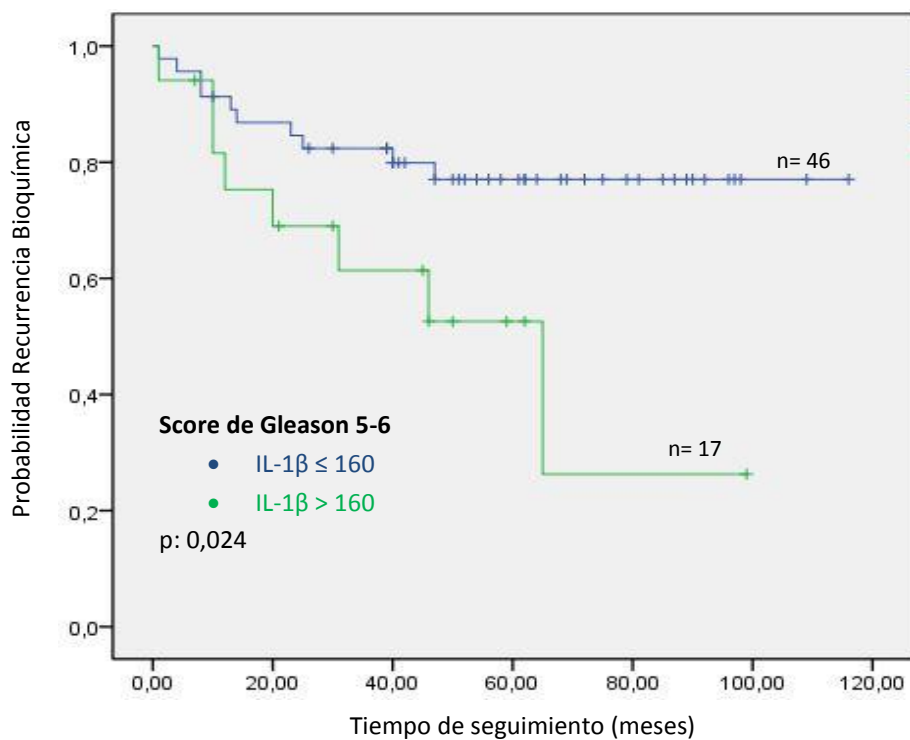


Figura 23 A: Curvas de probabilidad de recurrencia bioquímica de la IL-1 $\beta$  en CaP grado Gleason 5-6.

B

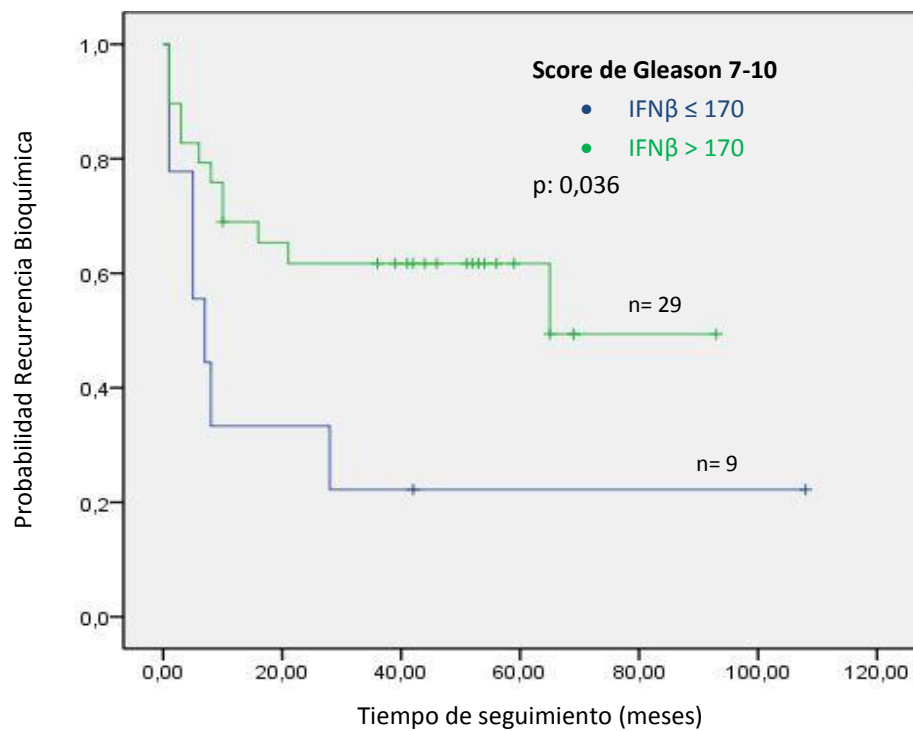
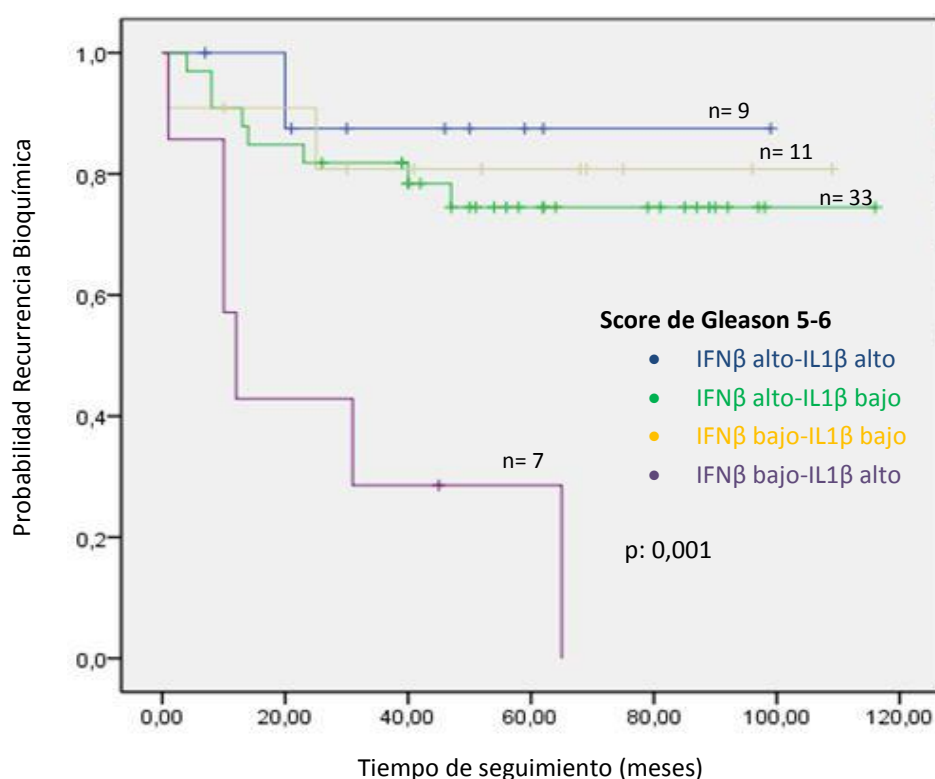


Figura 23 B: Curvas de probabilidad de recurrencia bioquímica del IFN $\beta$  en CaP grado Gleason 7-10.

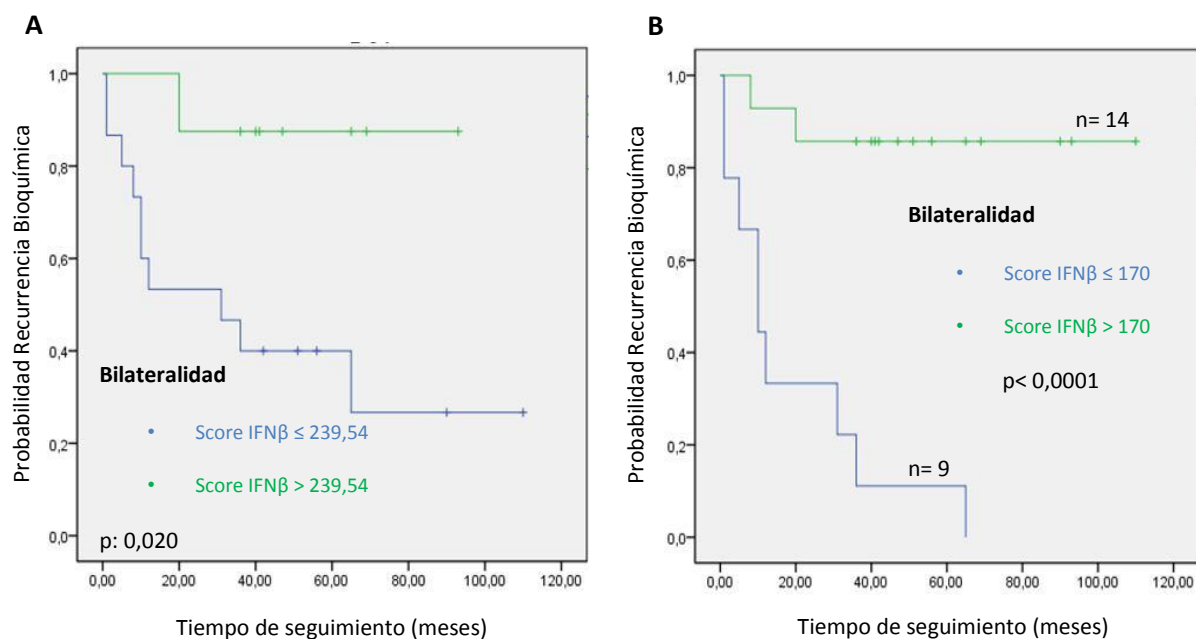
Adicionalmente a los resultados anteriores, es importante remarcar que hemos encontrado que en los pacientes con un grado Gleason 5-6, la combinación de la expresión simultánea de unos bajos niveles de expresión del IFN $\beta$  y altos de la IL-1 $\beta$ , identifica un subgrupo de pacientes (11,7%) con un peor pronóstico dentro de este grado Gleason ( $p= 0,001$ ), puesto que la probabilidad de recurrencia bioquímica sería mayor (Figura 24).



**Figura 24:** Curvas de probabilidad de recurrencia bioquímica en función de la expresión simultánea de ambos factores en el carcinoma prostático grado Gleason 5-6.

En cuanto a la localización tumoral, nuestros resultados muestran que en aquellos tumores prostáticos que infiltran de forma simultánea ambos lóbulos prostáticos, una mayor expresión del IFN $\beta$  se asocia de forma significativamente y negativamente, con la probabilidad de recurrencia bioquímica. Así este resultado se ve doblemente reforzado tanto cuando las curvas de recurrencia bioquímica se realizan en función de la mediana del score del IFN $\beta$  ( $p= 0,020$ )

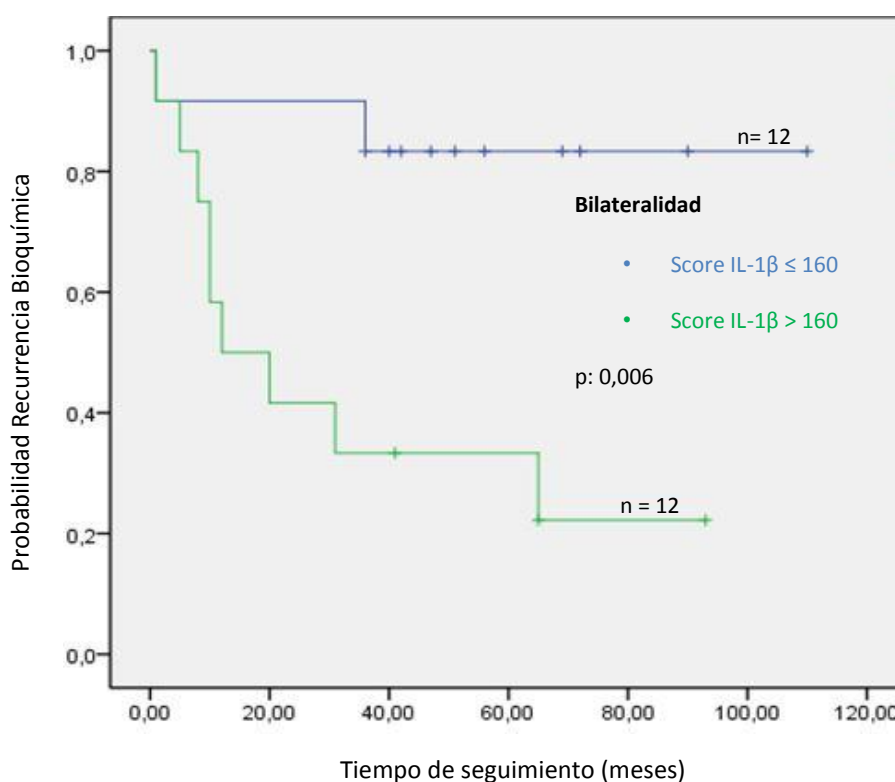
(Figura 25 A), como cuando son llevadas a cabo en función del punto de corte óptimo del IFN $\beta$  ( $p < 0,0001$ ) (Figura 25 B). Este hallazgo podría contribuir a un mejor conocimiento de las funciones protectoras del IFN $\beta$  en el carcinoma prostático, así como el pronóstico del mismo.



**Figura 25:** Curvas de probabilidad de recurrencia bioquímica en carcinomas prostáticos bilaterales en función del valor de score de la mediana del IFN $\beta$  (A) y en función del punto de corte óptimo del IFN $\beta$  (B).

Como muestra la figura 26, en aquellos pacientes con una localización bilateral del carcinoma prostático, una elevada expresión de la IL-1 $\beta$  en función del punto de corte óptimo anteriormente descrito, se asocia significativamente y positivamente con una mayor probabilidad de recurrencia bioquímica ( $p = 0,006$ ). Sin embargo, no hemos obtenido una asociación significativa cuando la asociación ha sido realizada en función de la expresión de la mediana del score de la IL-1 $\beta$ .

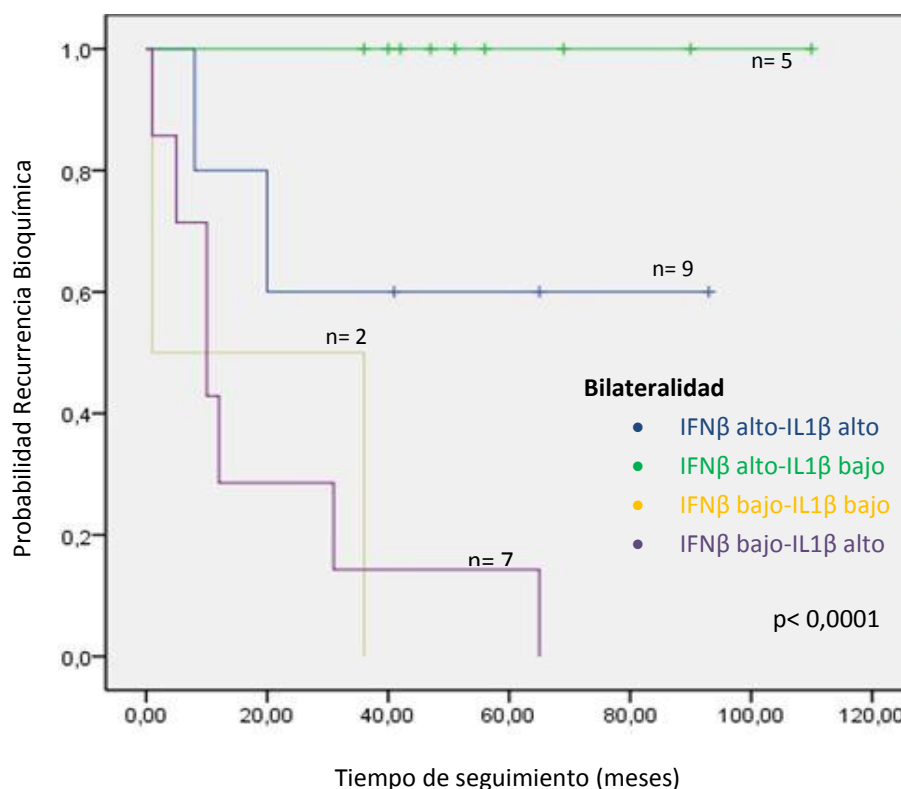




**Figura 26:** Curvas de probabilidad de recurrencia bioquímica en carcinomas prostáticos bilaterales en función del punto de corte óptimo de la IL-1β.

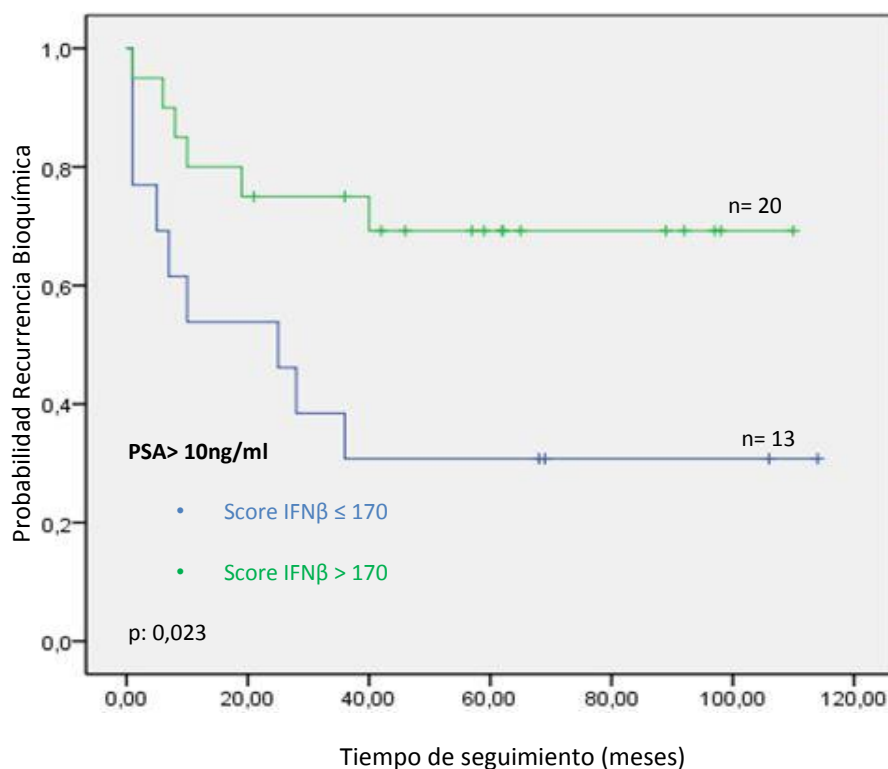
También hemos determinado las curvas de recurrencia bioquímica en pacientes con carcinoma prostático en función de la localización tumoral, de acuerdo a los puntos de corte óptimos establecidos para el IFNβ y para la IL-1β de forma combinada. Así, como se muestra en la figura 27, la expresión de la combinación de bajos niveles de IFNβ y la expresión simultánea de altos niveles de IL-1β, muestra una asociación significativa en cuanto a la probabilidad de recurrencia bioquímica en pacientes con tumor prostático bilateral ( $p < 0,0001$ ). Sin embargo, también se puede observar en las curvas de recurrencia que los bajos niveles de expresión del IFNβ, junto con la expresión de bajos niveles de la IL-1β, también estaría asociado a un peor pronóstico, lo que a pesar de tratarse de pocos casos en nuestro estudio, también podría apoyar la fuerte asociación protectora que lleva a cabo el IFNβ,

pudiendo así ayudar a prevenir la recurrencia bioquímica en pacientes con carcinoma prostático.



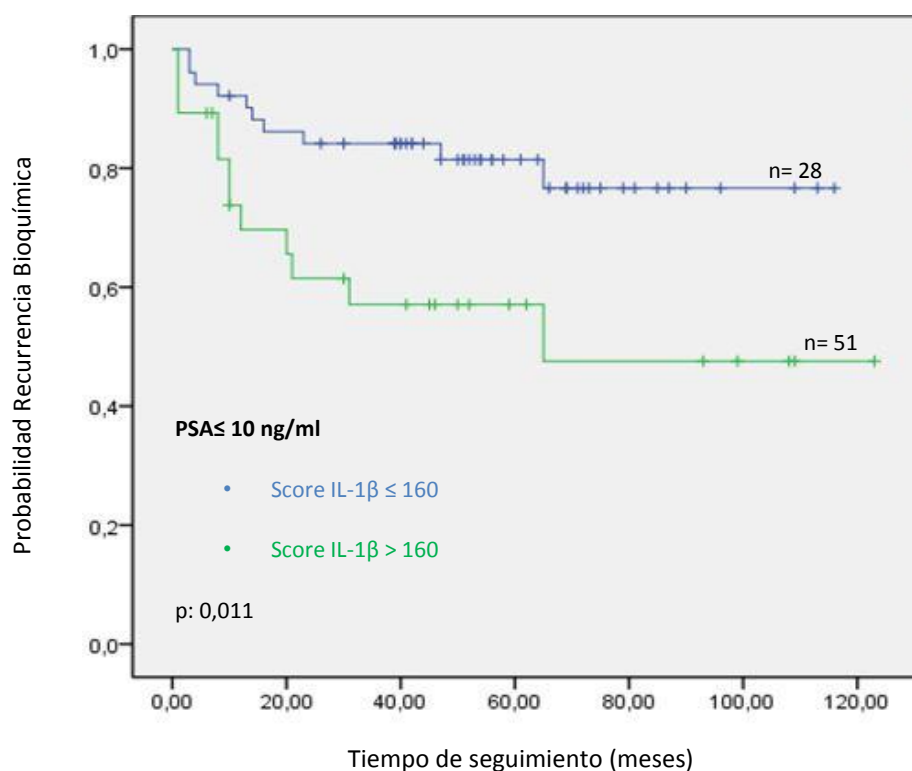
**Figura 27:** Curvas de probabilidad de recurrencia bioquímica en función de la expresión simultánea de ambos factores en el carcinoma prostático de localización bilateral.

Otro resultado importante que muestra nuestro estudio, es que en aquellos pacientes con unos niveles séricos de PSA previos a la biopsia prostática de más de 10 ng/ml, la probabilidad de recurrencia bioquímica es mayor cuando expresan bajos niveles de IFNβ ( $p= 0,023$ ), identificando a un 39,4% de pacientes de alto riesgo (Figura 28).



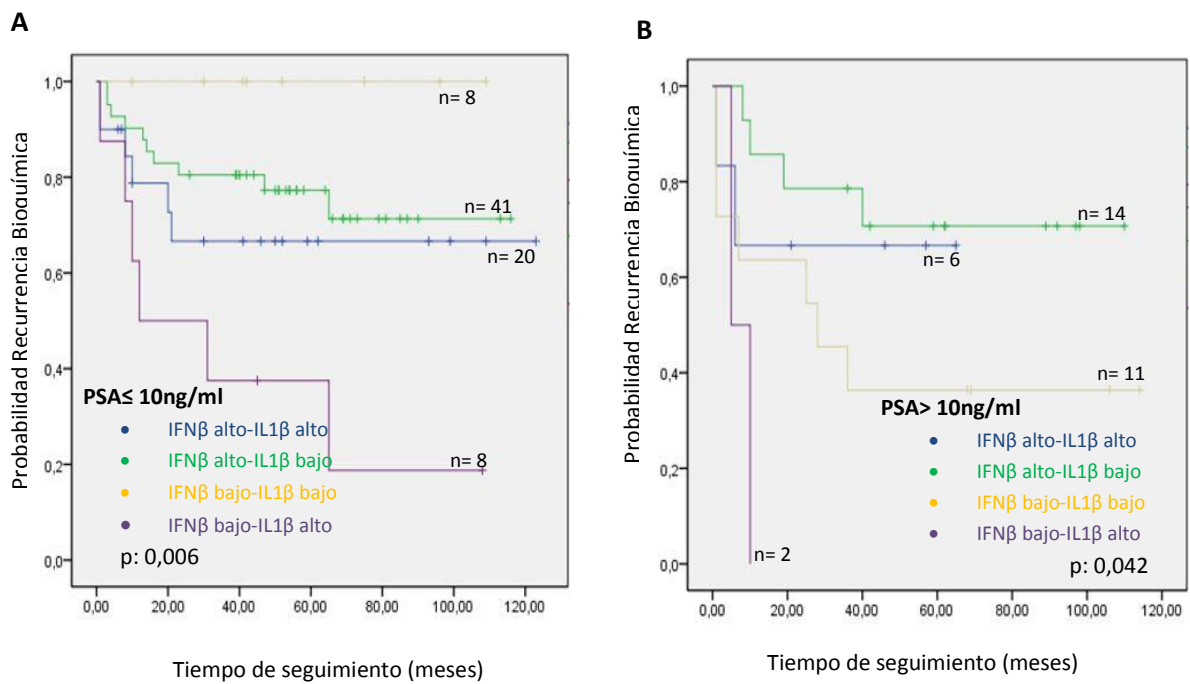
**Figura 28:** Curvas de probabilidad de recurrencia bioquímica en pacientes con PSA previo >10ng/ml en función del punto de corte óptimo del IFNβ.

De acuerdo con lo anteriormente señalado, y reafirmando el probable papel de la IL-1β como citoquina proinflamatoria, se continúa observando una asociación significativa entre los elevados niveles de la IL-1β y la mayor probabilidad de recurrencia bioquímica, aún en aquellos pacientes que presentan unos niveles séricos de PSA previo ≤ 10 ng/ml (p= 0,011). De este modo nuestro estudio ha identificado un 35,44% de pacientes con alto riesgo de recurrencia bioquímica pese a presentar unos niveles de PSA previo menores de 10 ng/ml (Figura 29).



**Figura 29:** Curvas de probabilidad de recurrencia bioquímica en pacientes con PSA previo  $<10\text{ng/ml}$  en función del punto de corte óptimo de la IL-1 $\beta$ .

Como se muestra en la figura 30, la combinación de la expresión simultánea de unos bajos niveles de IFN $\beta$ , y unos altos niveles de IL-1 $\beta$ , en pacientes con niveles séricos de PSA previo  $\leq 10\text{ ng/ml}$  (Figura 30 A), se asocia con peor pronóstico ( $p= 0,006$ ). Sin embargo, en aquellos pacientes con PSA previo a la biopsia prostática  $> 10\text{ ng/ml}$ , la expresión simultánea de altos niveles de IFN $\beta$  y bajos niveles de IL-1 $\beta$  (Figura 30 B), se asocia significativamente con un mejor pronóstico ( $p= 0,042$ ) a pesar de los niveles de PSA previo. Estos resultados parecen seguir mostrando el papel protector que presenta el IFN $\beta$  en el cáncer de próstata, contribuyendo así a una mayor exactitud de la evaluación pronóstica en pacientes sometidos a prostatectomía radical.



**Figura 30:** Curvas de probabilidad de recurrencia bioquímica en función de la expresión simultánea de ambos factores en el carcinoma prostático en pacientes con PSA previo ≤ 10 ng/ml (A) y niveles de PSA >10 ng/ml (B).

## **8. Relación de la expresión de los factores a estudio con la supervivencia de los pacientes**

Los resultados estadísticos de nuestro estudio no muestran resultados significativos en cuanto a la relación entre la expresión de IFN $\beta$ , NFkB, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17; y la supervivencia total de los pacientes con CaP.

## **9. Análisis multivariante**

El análisis multivariante según el modelo de regresión de Cox, indica que el estadio tumoral (T3-4: riesgo relativo, RR=5,10; con un intervalo de confianza del 95%, CI: 2,6-9,9;  $p < 0,0001$ ) se asocia significativamente y de forma independiente con la recurrencia bioquímica. Además, este mismo análisis ha mostrado que el punto de corte óptimo de 170 para el IFN $\beta$  (RR= 0,49 (0,3-0,9);  $p = 0,035$ ), también ha sido un factor independiente asociado con la recurrencia bioquímica en pacientes con cáncer de próstata.

# Discusión



La notable prevalencia de la HBP, así como la creciente incidencia del CaP a nivel mundial y su elevada prevalencia, han hecho que estas patologías sean consideradas como una comorbilidad más asociada a la edad (158). Sin embargo, el CaP constituye una enfermedad heterogénea que puede ir desde asintomática a una enfermedad maligna que evoluciona rápidamente hacia la muerte del paciente.

Un adecuado procedimiento clínico del CaP, podría encontrarse en la individualización de los tratamientos. Por ello, podemos afirmar que existen dos aspectos fundamentales en este tipo de tumor: en primer lugar, para prevenir la aparición del mismo, destaca la importancia de identificar los factores de riesgo y/o la vía molecular necesaria para la carcinogénesis de la próstata. En segundo lugar, es necesario poder diferenciar entre el CaP como tumor asintomático, y el CaP más agresivo que supone un riesgo potencial para el paciente. Respecto al primer punto, la diversidad de anomalías genéticas identificadas sugiere que no existe una sola vía molecular dominante para la carcinogénesis prostática (159, 160).

Por otro lado, aunque el score Gleason en el examen histopatológico constituye el mejor indicador pronóstico actualmente en el CaP, se ha demostrado que puede existir cierta variabilidad inter-observador. Asimismo, dos casos de carcinoma prostático morfológicamente idénticos, pueden evolucionar de forma diferente (158). Por todo ello, es necesario el estudio de nuevos parámetros biológicos que nos indiquen nuevos factores de riesgo para la carcinogénesis prostática, así como nuevos factores pronósticos que determinen la evolución de la misma.

Con el avance en nuevas técnicas para la detección de cáncer, cada vez más pacientes son diagnosticados con la enfermedad localizada, mientras que el número de pacientes con

enfermedad diseminada, va en descenso. Actualmente, no existe un tratamiento óptimo para el carcinoma prostático localizado. Considerando que numerosos pacientes en este grupo podrían beneficiarse del tratamiento quirúrgico radical o la radioterapia, un número significativo de ellos van a desarrollar recurrencia bioquímica o incluso, en última instancia, diseminación de la enfermedad. Además, tanto la cirugía como la radioterapia pueden provocar numerosos efectos secundarios, como pueden ser daño en otros órganos como la vejiga o intestino o interferencia con el funcionamiento sexual del paciente. Por ello resulta necesario el descubrimiento de nuevas terapias más eficaces y que reduzcan los efectos secundarios, curando los tumores localizados y evitando la aparición de metástasis (112).

Sabemos que la inflamación crónica juega un importante papel en numerosos cánceres; ejemplo de ello puede ser la relación entre el cáncer de esófago y el esófago de Barret, la enfermedad inflamatoria intestinal y el cáncer de colon, la infección por el virus de la hepatitis C y la aparición de hepatocarcinoma, o la relación del *helicobacter pylori* y el cáncer gástrico. Se estima que las infecciones subyacentes y las reacciones inflamatorias están vinculadas al 25% de todos los cánceres. Es por ello que en numerosas investigaciones se ha estudiado el papel de la inflamación crónica a través de las citoquinas pro y anti-inflamatorias (69, 98, 161).

A pesar de que todavía no se comprenden bien todas estas vías de inflamación prostática, la evidencia hasta la fecha sugiere que los procesos inflamatorios que afectan tanto a la próstata como a la vejiga, juegan un importante papel en el desarrollo y mantenimiento del crecimiento prostático y los STUI. En todas las enfermedades prostáticas, los procesos inmunológicos e inflamatorios, o bien tienen una importante función en la patogénesis, o bien actúan como potenciales desencadenantes de la propia enfermedad. Además, el daño

tisular y el subsiguiente proceso crónico de cicatrización inducida por la inflamación, terminan en el desarrollo de nódulos de HBP (8).

El mejor conocimiento de estos mecanismos biológicos, así como la posible relación entre los niveles de PSA circulante y la expresión tisular de algunas citoquinas, es lo que nos ha llevado a la realización de este estudio, con el objetivo de poder mejorar el procedimiento clínico y encontrar nuevas dianas terapéuticas en estos pacientes.

En nuestro estudio, se determina el comportamiento y expresión de seis factores relacionados con la inflamación, como son el IFN $\beta$ , el NF $\kappa$ B, la IL-1 $\beta$ , la IL-6, la IL-10 y la IL-17, en tejido prostático hiperplásico y tumoral; intentando dilucidar las posibles diferencias en su patrón de expresión, dependiendo del proceso prostático del que se trate.

Comparando ambos procesos, podemos afirmar que existe una variabilidad en la expresión de determinados factores en la HBP y en el CaP; mostrando una mayor expresión global en el tejido tumoral la IL-1 $\beta$  y la IL-17, mientras que el IFN $\beta$  y la IL-6 han sido más expresados en hiperplasia.

Nuestros resultados muestran la asociación existente entre la expresión de las proteínas inflamatorias analizadas y las células, ya sean tumorales o células estromales (fibroblastos y células mononucleares inflamatorias) en los carcinomas prostáticos. Los fibroblastos asociados a carcinomas (FACs) constituyen un volumen importante del estroma tumoral y juegan un papel decisivo en el crecimiento tumoral, su diseminación e incluso la resistencia a fármacos de estos tumores. Otro elemento importante en el estroma tumoral es el componente inmunológico/inflamatorio (162). En diferentes estudios ya se ha descrito la importancia de las células mononucleares inflamatorias, puesto que están presentes ya en fases muy tempranas del desarrollo del tumor, y en estrecha relación con áreas de

hiperplasia y atipia (163, 164). Por lo tanto, nuestros datos muestran y reafirman la contribución del estroma tumoral a la hora de establecer el perfil molecular de los carcinomas de próstata.

A pesar de la ausencia de diferencias significativas en función del tipo celular, puesto que todas las células expresaron de forma similar los factores a estudio; nuestros resultados sí han mostrado una amplia variabilidad en la expresión global de los factores. Además de ello, hemos encontrado un punto de corte para los valores de expresión del IFN $\beta$  y de la IL-1 $\beta$  capaz de predecir una mayor recurrencia bioquímica en los pacientes incluidos en el presente estudio y que han sido sometidos a prostatectomía radical (165). Este hallazgo resulta especialmente relevante dado la ausencia de definición de los marcadores bioquímicos actuales para el cáncer de próstata. Existe una imperiosa necesidad de identificar dichos marcadores bioquímicos de forma sistemática y específica, puesto que esto podría ayudarnos a discernir a aquellos pacientes susceptibles de tratamiento quirúrgico definitivo, frente a los pacientes cuyo óptimo tratamiento de la enfermedad sería el conservador.

Como ya hemos dicho anteriormente ya se ha descrito que las citoquinas proinflamatorias, tales como las interleuquinas e interferones, producidas por el microambiente tumoral, influyen en el desarrollo del tumor. Pero también cabe la posibilidad de que la expresión de estas citoquinas influya de forma diferente en el pronóstico de la enfermedad en función del tipo de tumor. Por todo ello, hemos seleccionado los factores a estudio basándonos en resultados previos que habían observado la relación del IFN $\beta$ , NF $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6 e IL-17, con el desarrollo de metástasis a distancia en el cáncer de mama (104). En consideración a lo anteriormente señalado, existen estudios que demuestran similitudes conocidas entre el cáncer de mama y el de próstata en relación a las características

epidemiológicas, alteraciones genéticas comunes, así como características comunes muy similares (106). Asimismo, nuestros estudios preliminares también han encontrado indicios de que la sobreexpresión de algunas citoquinas y otros factores pro-inflamatorios, se encuentran asociados con la recurrencia bioquímica en pacientes con carcinoma prostático (69). Como podemos comprobar, hoy en día existen cada vez más evidencias de estudios experimentales que defienden el importante papel que juegan estas proteínas inflamatorias en el cáncer de próstata. En esta línea, un reciente estudio ha encontrado en el estroma prostático tumoral, una vía de citoquinas proinflamatorias dirigidas en gran parte por el NFkB. En sus resultados muestran como estas células han sido capaces de incrementar los niveles de SDF1, IL-6 e IL-1 $\beta$ , promoviendo la infiltración macrofágica, la angiogénesis y como consecuencia de ello, en definitiva, promoviendo el crecimiento tumoral. Bloqueando el SDF1/CXCR4 así como el antagonista de CXCR4, AMD3100, han mostrado prometedores resultados en los que son capaces de inhibir el crecimiento tumoral y disminuir el reclutamiento de células derivadas de la médula ósea (166). Recientes estudios también han informado de la importancia del NFkB, no sólo en el desarrollo del CaP andrógeno-independiente, y la progresión metastásica, sino que también lo han postulado como una posible diana terapéutica (122).

A pesar de que una de las numerosas funciones llevadas a cabo por el NFkB, es la de la regulación de la IL-1 $\beta$  y el IFN $\beta$  (114); no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre este factor de transcripción y su expresión global en la HBP ni en el CaP. Del mismo modo que tampoco hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre la expresión de este factor y las características clínico-patológicas de los pacientes, la recurrencia bioquímica o supervivencia de los mismos (165).

Otros importantes hallazgos que continúan relacionando estos factores con la inflamación y la progresión tumoral, ha sido la reciente identificación de macrófagos expresando altos niveles de IL-17 en lesiones atróficas proinflamatorias en pacientes con CaP (143). En nuestro estudio, la mayor expresión de IL-17 en aquellos pacientes con CaP en estadio tumoral T3 o asociando los estadios tumorales T3-T4, se ha asociado con un peor pronóstico de la enfermedad.

Sin embargo, de todas estas asociaciones entre las diferentes proteínas inflamatorias, nuestros resultados han relacionado de forma clara y reiterativa al IFN $\beta$  y a la IL-1 $\beta$  con el pronóstico y recurrencia bioquímica de nuestros pacientes a estudio.

Los interferones son un grupo de citoquinas que actúan como mecanismo de defensa contra las infecciones virales y tienen la capacidad de interferir con el proceso de transformación. Los primeros estudios demuestran que este grupo de citoquinas es capaz de inhibir el crecimiento del tumor cuando son secretados en el entorno del microambiente tumoral (167). Hoy en día existen diferentes evidencias que indican que esta citoquina posee diferentes efectos antitumorales. Se ha demostrado que las células tumorales pueden ser inducidas a través de la vía del TLR4, para producir IFN y posiblemente contribuir así a la respuesta inmune antitumoral (168). También se ha demostrado que los IFNs de tipo I (IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ ) inducen la autofagia en determinadas líneas celulares del cáncer en humanos (169). Por otra parte el IFN parece cooperar con el gen p53 en la supresión tumoral y la respuesta frente al estrés tumoral (170). Además recientemente se ha informado de su interacción con las formas mutantes de p53, pudiendo tener un importante efecto antitumoral. Los FACs inducen la vía del IFN en respuesta a la presencia de células cancerígenas; dicha respuesta se ve acentuada cuando las células cancerígenas expresan formas mutantes de p53. Estos datos ponen de relieve las propiedades oncogénicas

mutantes de p53, en el contexto del microambiente tumoral, y sugieren que los pacientes con cáncer y formas mutantes de p53, puedan beneficiarse del tratamiento con IFN (171). Sobre la base de todos estos datos, IFN $\beta$  constituye un potente candidato para los fármacos antitumorales, sin embargo, el IFN recombinante resulta demasiado inestable para su uso en la terapia de tumores in vivo (172).

Siguiendo en esta línea, nuestros resultados indican que la expresión del IFN $\beta$  es mayor en la hiperplasia, actuando como un factor inflamatorio hipotéticamente dotado de cierta protección frente al desarrollo del proceso tumoral (165). Este hallazgo apoya el estudio llevado a cabo por Dong et al. (107), en el que demostraron que las células prostáticas cancerosas altamente metastásicas diseñadas para producir constitutivamente IFN $\beta$ , cuando se inyectan en modelos murinos con inmunodepresión son incapaces de producir tumores o metástasis. Este efecto está mediado por diversos mecanismos, incluyendo la activación de los macrófagos del huésped y la inhibición de la angiogénesis tumoral.

Adicionalmente a lo anterior, nuestros estudios parecen demostrar de forma reiterada el papel protector del IFN $\beta$ , puesto que en aquellos pacientes con estadios tumorales relativamente tempranos o con un determinado grado Gleason o incluso en pacientes con localización tumoral bilateral, la mayor expresión del IFN $\beta$  parece estar relacionada con un mejor pronóstico en cuanto a recurrencia bioquímica.

La IL-1 $\beta$  es un componente central del entorno de las citoquinas que acompañan de forma habitual a la inflamación aguda, la inflamación crónica e incluso a la enfermedad vírica. Se trata de un importante mediador de la inflamación relacionado con el cáncer, que puede ser secretado tanto por las células inmunes, como por las células estromales o tumorales. Esta citoquina también es capaz de intervenir en la regulación de importantes genes

relacionados con la inflamación y el cáncer (173). Asimismo, también se ha demostrado en recientes estudios que la inhibición de la IL-1 $\beta$  es capaz de disminuir el crecimiento tumoral limitando el proceso inflamatorio e induciendo la maduración de células mieloides inmaduras en los macrófagos. En contraste con lo anterior, sólo se observó la inhibición transitoria del crecimiento tumoral después de la neutralización del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), seguida de la recurrencia del tumor mediada por la angiogénesis de rebote (174). Además, los niveles de IL-1 $\beta$  se encuentran incrementados en numerosos procesos neoplásicos agresivos como es el cáncer colo-rectal, promoviendo la renovación e invasividad de las células del cáncer de colon a través de la activación y mediación de determinadas vías moleculares y marcadores, como el Zeb 1 (175, 176).

Del mismo modo, la elevada expresión de la IL-1 $\beta$  y su receptor IL-1R1 también se encuentran relacionados con el cáncer de ovario, reprimiendo la p53 y actuando como factores independientes en la supervivencia de los pacientes afectados por este tipo de tumores. Con todo ello estamos intentando demostrar que la IL-1 $\beta$  es una citoquina crítica implicada en la comunicación entre las células cancerosas y los fibroblastos del estroma, actuando para facilitar el desarrollo del cáncer de ovario a través de la generación protumorigénica de fenotipos inflamatorios en los fibroblastos del estroma (177). Además es importante destacar un reciente hallazgo que muestra que la IL-1 $\beta$  favorece la colonización esquelética y la progresión metastásica de las células prostáticas cancerígenas con un fenotipo neuroendocrino adquirido (178).

Existen estudios que han utilizado el análisis de toda la expresión del genoma de las células cancerígenas prostáticas humanas con diferentes comportamientos metastásicos, en modelos animales, para revelar que el fenotipo óseo-trópico regula al alza tres genes codificados por la citoquina IL-1 $\beta$ , la quimioquina CXCL6 (GCP-2) y la proteasa



inhibidora Elafina (P13). La base de datos *Oncomine* revela que estos tres genes están significativamente elevados en cáncer de próstata frente al tejido normal, correlacionándose con un Gleason  $\geq 7$ . Esta correlación fue validada por la IL-1 $\beta$  por inmuno-detección en tejidos de arrays de próstata. Estos estudios demuestran que la sobreexpresión exógena de IL-1 $\beta$  en las células cancerosas no metastásicas promueve su crecimiento en las lesiones esqueléticas en ratones, mientras que su caída deteriora significativamente la progresión ósea de células altamente metastásicas. Por otra parte, La IL-1 $\beta$  secretada por las células metastásicas, induce la sobreexpresión de la COX-2 (PTGS2) en las células mesenquimales óseas humanas. También se han investigado las muestras de tejido humano de metástasis óseas, detectándose células de cáncer de próstata positivas tanto para la IL-1 $\beta$  como para la sinaptofisina (SYP), mientras que al mismo tiempo carecen de la expresión del antígeno prostático específico (PSA, KLK3). Por todo ello, estos hallazgos indican que la IL-1 $\beta$  favorece la colonización esquelética y la progresión metastásica de las células del CaP con un fenotipo neuroendocrino adquirido (178).

Contrariamente a lo sucedido con el IFN $\beta$ , hemos comprobado que la expresión de la IL-1 $\beta$  es mayor en el tejido tumoral que en el hiperplásico (165). Este resultado parece muy interesante teniendo en cuenta que en el estudio de Ricote y cols. (124) se relaciona la familia de la IL-1, concretamente la expresión de la IL-1 $\alpha$  y la IL-1Ra, con el CaP, encontrándose niveles de expresión más elevados, en comparación con la próstata normal e hiperplásica. Este dato deja abierta la posibilidad de que esta familia de la IL-1 intervenga, con todos sus factores, en la progresión tumoral prostática.

Además, nuestros datos muestran como la combinación de una elevada expresión de la IL-1 $\beta$  y baja del IFN $\beta$ , aumenta la probabilidad de recurrencia bioquímica, lo que empeoraría

el pronóstico de este tipo de tumores. Este resultado resulta de interés si además tenemos en cuenta que la elevada expresión de la IL-1 $\beta$  se relaciona también con peor pronóstico en pacientes con un determinado grado Gleason y en tumores bilaterales.

La IL-6 posee funciones pleiotrópicas activando numerosos tipos celulares que expresan el receptor gp130 y el receptor de membrana de la IL-6 (179). Dada la importancia de la vía de señalización de la IL-6 interviniendo en la activación de Jak/Stat3 en el cáncer, el bloqueo de la IL-6 utilizando ligandos de anticuerpos o receptores bloqueadores, ya ha sido probada con éxito en estudios preclínicos, con resultados positivos cuando se utiliza sola o en combinación. Un anticuerpo bloqueador del receptor de IL-6 (IL-6R) (tocilizumab) ha sido aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Castelman y la artritis reumatoidea, así como resulta muy probable su uso en el cáncer (180, 181). Por otra parte, un ligando bloqueador de la IL-6 (CNTO-328) está siendo probado en diferentes ensayos clínicos en fase I/II en el cáncer de próstata resistente a la castración química (182, 183). Basándonos en el éxito de los ensayos preclínicos en varios modelos de cáncer como el de ovario, cáncer de mama o de próstata, el papel de la inhibición del gen Jak usando el inhibidor de Jak 1/2, AZD1480, se está probando ahora en la fase I de ensayos clínicos para tumores sólidos (184).

En respuesta a los patógenos, las células inmunitarias innatas regulan rápidamente al alza las citoquinas pro-inflamatorias que sirven para iniciar la defensa del huésped contra la invasión microbiana. Sin embargo, la inflamación excesiva puede causar daño a los tejidos así como la activación de células T y B que pueden tener efectos deletéreos sobre el tejido. Para evitar daños colaterales en dichas circunstancias, se desarrollan una serie de mecanismos de regulación que incluyen la generación de células T reguladoras, así como la producción de IL-10, manteniendo la correcta homeostasis del sistema inmune. La IL-10

es una potente citoquina antiinflamatoria con amplios efectos sobre el sistema inmune, tanto innato como adaptativo (185-187). Durante la infección bacteriana o viral, la IL-10 es producida por macrófagos y células dendríticas como un mecanismo de retroalimentación negativa para amortiguar la producción incontrolada de citoquinas inflamatorias. Además de las células innatas, las células T, especialmente las reguladoras, son capaces de producir IL-10 para inhibir la activación de las células específicas de antígeno y la respuesta inflamatoria. Recientemente, diferentes estudios de investigación, incluyendo los nuestros, indican que el IFN de tipo I es capaz de ejercer su papel antiinflamatorio a través de la inducción de IL-10 e IL-27, a partir de macrófagos y células dendríticas (187-190).

Existen estudios que demuestran que el tratamiento con IFN $\beta$  de células T cultivadas bajo condiciones de polarización de Th17, resulta en una reducción en la producción de IL-17, pero en un incremento en la producción de IL-10. También se encontró una producción de IFN $\beta$  inducida por la IL-10, por células T específicas de antígeno derivadas de ratones inmunizados. Además, el tratamiento con IFN $\beta$  podría suprimir la actividad encefalitogénica de las células T específicas para la mielina, así como mejorar los síntomas clínicos de la encefalitis alérgica experimental (EAE) en un modelo de transferencia adoptiva. Con todo ello, los resultados de este estudio sugieren que el IFN $\beta$  puede inducir a las células T específicas de antígeno para producir IL-10, que a su vez regulan negativamente la respuesta Th17, mediando la respuesta inflamatoria y autoinmune (191).

El PSA producido por la glándula prostática, parece encontrarse en niveles elevados en sangre al inicio del desarrollo del CaP y en paralelo con la progresión de la enfermedad. El PSA se encuentra regulado por receptores androgénicos (AR). A pesar de la sensibilidad inicial, las células del CaP se han vuelto notablemente más resistentes a las terapias actuales; pero el mecanismo del desarrollo del CaP andrógeno-independiente continúa

siendo desconocido. Sin embargo, la evidencia acumulada sugiere que el fenotipo andrógeno-independiente surge cuando las células prostáticas cancerígenas adquieren un mecanismo de secreción autocrino o paracrino a través de la producción de factores de crecimiento y citoquinas. En este estado de la enfermedad el gen productor de PSA continúa siendo expresado. Varias vías de transducción intracelular están involucradas en la regulación de la expresión del PSA y su producción (MAPK, JAK, STAT, PKA, PI3K/Akt...) (192). Los resultados de nuestro estudio muestran una relación significativamente negativa en HBP, entre el IFN y la IL-1 $\beta$  y los niveles de PSA sérico. Un resultado que también resulta de interés en nuestro estudio, es el hecho de que en aquellos pacientes con altos niveles de PSA previos a la biopsia, pero que sin embargo presentan una elevada expresión de IFN $\beta$ , presentan una baja recurrencia bioquímica, lo cual mejora el pronóstico. Por el contrario, los pacientes con bajos niveles de PSA previo, pero con baja expresión del IFN $\beta$ , tienen un peor pronóstico. Sin embargo, también resulta llamativo el hecho de que a pesar de que los pacientes tengan bajas cifras de PSA sérico previo, si expresan altos niveles de IL-1 $\beta$ , su pronóstico en cuanto a recurrencia bioquímica será peor. Lo que impresiona del mayor peso pronóstico que juega la expresión de estas citoquinas, independientemente del valor del PSA presentado por el paciente con cáncer de próstata.

De acuerdo con todas estas evidencias, nuestros resultados indican que una elevada expresión intratumoral de IL-1 $\beta$  predice la recurrencia bioquímica en los pacientes con CaP sometidos a prostatectomía radical, mientras que la baja expresión de IFN $\beta$  se asoció negativamente con este indicador de progresión del tumor. También fue relevante el hallazgo que indica que la combinación de estas expresiones, alta y baja, respectivamente, identifica un pequeño subgrupo de pacientes con mayor posibilidad de recurrencia

bioquímica postoperatoria. Este hallazgo puede tener interés clínico y puede ser indicativo de la señalización inflamatoria del microambiente del tumor que afecta a la progresión tumoral. Respecto a esto, se ha informado recientemente de la regulación negativa y la inhibición de la respuesta de las células de señalización del IFN $\alpha/\beta$  inducida por citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  en los melanomas (193).

Resulta indudable que actualmente uno de los retos en el manejo clínico del cáncer de próstata es la precisa predicción de la agresividad del tumor y la progresión de la enfermedad. Por ello, el mejor conocimiento de los múltiples biomarcadores moleculares, podría ofrecer la posibilidad de una mejor estratificación de los pacientes con características clínico-patológicas similares. Estos resultados, indican la necesidad de estudiar el papel potencial de nuevos factores relacionados con el proceso inflamatorio, que podrán ser interpretados y utilizados como posibles dianas terapéuticas o como factores de riesgo para el desarrollo de la carcinogénesis prostática.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que el equilibrio entre ambas citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, puede verse reflejado en el microambiente tumoral y en consecuencia tener importancia pronóstica. Tanto la IL-1 $\beta$  como el IFN $\beta$  pueden actuar como posibles biomarcadores para diferenciar el alto o bajo riesgo en pacientes que también podrían verse beneficiados de un tratamiento previamente seleccionado más apropiado. Más estudios preclínicos y clínicos dirigidos a la investigación de moléculas inflamatorias, podrían ser una opción terapéutica prometedora y atractiva para el tratamiento del CaP, teniendo un papel cada vez más destacado en las estrategias futuras de tratamiento.

# Conclusiones

1. La expresión global del IFN $\beta$  es mayor en el tejido prostático hiperplásico, mientras que la expresión global de la IL-1 $\beta$  es mayor en el tejido tumoral prostático.
2. Tanto en el CaP como en la HBP, los factores a estudio son expresados por el estroma y por las células epiteliales, por lo que podemos concluir que la diferencia de expresión reside en el nivel de expresión, independientemente del tipo celular.
3. Existe una correlación directa entre la expresión simultánea del IFN $\beta$  y la IL-1 $\beta$ , tanto en tejido hiperplásico prostático como en el tumoral.
4. Una elevada expresión de la IL-1 $\beta$  se relaciona con la afectación bilateral de los carcinomas prostáticos. Sin embargo, en el tejido prostático hiperplásico, una mayor expresión del IFN $\beta$  se relaciona con menores niveles séricos de PSA previos a la biopsia prostática.
5. Los valores de expresión más altos de la IL-1 $\beta$  se han relacionado con una mayor probabilidad de recurrencia bioquímica. Por el contrario, unos valores de expresión elevados del IFN $\beta$  mejoran el pronóstico de estos pacientes. La expresión simultánea de ambos factores nos permite establecer un pronóstico más exacto en cuanto a la recurrencia bioquímica de los pacientes con carcinoma prostático, hecho importante en pacientes con estadio tumoral o grado Gleason intermedio. Así mismo, los pacientes con PSA previo bajo pero expresión simultánea de IFN $\beta$  baja e IL-1 $\beta$  alta, tendrán peor pronóstico a pesar de los niveles iniciales de PSA.

En el presente estudio no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de IFN $\beta$ , NFk $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17 y la supervivencia global del proceso.

# Bibliografía



1. JI E. The prostate and seminal vesicles. In: SS S, editor. Diagnostic Surgical Pathology. New York 1989. p. 1393-432.
2. Walsh R, Vaughan, Wein. Anatomía del tracto urinario inferior y los genitales masculinos. En: Campbell Urología. 8 ed. Madrid: Panamericana, 2004, p.64-83.
3. Fritjofsson A, Kvist U, Ronquist G. Anatomy of the prostate. Aspects of the secretory function in relation to lobar structure. Scand J Urol Nephrol Suppl. 1988;107:5-13.
4. Bianchi-Frias D, Vakar-Lopez F, Coleman IM, Plymate SR, Reed MJ, Nelson PS. The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. PLoS One. 2010;5(9).
5. McNeal JE. Normal histology of the prostate. Am J Surg Pathol. 1988 Aug;12(8):619-33.
6. Kramer G, Mitteregger D, Marberger M. Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease? Eur Urol. 2007 May;51(5):1202-16.
7. Yoo TK, Cho HJ. Benign prostatic hyperplasia: from bench to clinic. Korean J Urol. 2012 Mar;53(3):139-48.
8. Bostanci Y, Kazzazi A, Momtahn S, Laze J, Djavan B. Correlation between benign prostatic hyperplasia and inflammation. Curr Opin Urol. 2013 Jan;23(1):5-10.
9. Vikram A, Jena GB, Ramarao P. Increased cell proliferation and contractility of prostate in insulin resistant rats: linking hyperinsulinemia with benign prostate hyperplasia. Prostate. 2010 Jan 1;70(1):79-89.
10. Kristal AR, Arnold KB, Schenk JM, Neuhaus ML, Goodman P, Penson DF, et al. Dietary patterns, supplement use, and the risk of symptomatic benign prostatic hyperplasia: results from the prostate cancer prevention trial. Am J Epidemiol. 2008 Apr 15;167(8):925-34.
11. Parsons JK, Im R. Alcohol consumption is associated with a decreased risk of benign prostatic hyperplasia. J Urol. 2009 Oct;182(4):1463-8.
12. Chartier-Kastler E, Leger D, Comet D, Haab F, Ohayon MM. Prostatic hyperplasia is highly associated with nocturia and excessive sleepiness: a cross-sectional study. BMJ Open. 2012;2(3).
13. Penna G, Fibbi B, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Laverny G, et al. Human benign prostatic hyperplasia stromal cells as inducers and targets of chronic immuno-mediated inflammation. J Immunol. 2009 Apr 1;182(7):4056-64.
14. De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schroder F, et al. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. Eur Urol. 2011 Jul;60(1):106-17.
15. Roehrborn CG. Definition of at-risk patients: baseline variables. BJU Int. 2006 Apr;97 Suppl 2:7-11; discussion 21-2.
16. Eiro N, Gonzalez L, Gonzalez LO, Andicoechea A, Fernandez-Diaz M, Altadill A, et al. Study of the Expression of Toll-Like Receptors in Different Histological Types of Colorectal Polyps and Their Relationship with Colorectal Cancer. J Clin Immunol. 2012 Feb 29.
17. Lucia MS, Lambert JR. Growth factors in benign prostatic hyperplasia: basic science implications. Curr Urol Rep. 2008 Jul;9(4):272-8.
18. Konwar R, Chattopadhyay N, Bid HK. Genetic polymorphism and pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. BJU Int. 2008 Aug 5;102(5):536-44.
19. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. Lancet. 2003 Mar 8;361(9360):859-64.
20. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. Eur J Cancer. 2001 Oct;37 Suppl 8:S4-66.
21. Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. Urology. 2003 Dec 22;62(6 Suppl 1):3-12.
22. Schaid DJ. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. Hum Mol Genet. 2004 Apr 1;13 Spec No 1:R103-21.
23. Espey DK, Wu XC, Swan J, Wiggins C, Jim MA, Ward E, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2004, featuring cancer in American Indians and Alaska Natives. Cancer. 2007 Nov 15;110(10):2119-52.

24. Farwell WR, Linder JA, Jha AK. Trends in prostate-specific antigen testing from 1995 through 2004. *Arch Intern Med.* 2007 Dec 10;167(22):2497-502.
25. Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, Wu X, Jamison PM, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer.* 2004 Jul 1;101(1):3-27.
26. Nelen V. Epidemiology of prostate cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2007;175:1-8.
27. 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 Jun;61(6):1079-92.
28. Herranz F AF, Arrizabalaga R y cols. El cáncer de próstata en la Comunidad de Madrid en el año 2000. Incidencia. *Actas Urología, España.* 2003;7:11.
29. A. M. El cáncer de próstata en Andalucía 2004. *Dispublic S, editor*2006.
30. Bernal M, Romero FJ, Souza DL, Gomez-Bernal FJ, Gomez-Bernal GJ. [Estimation of the projections of incidence rates, prevalence and mortality due to prostate cancer in Aragon (Spain)]. *Actas Urol Esp.* 2011 Sep;35(8):470-4.
31. Sanchez MJ, Payer T, De Angelis R, Larranaga N, Capocaccia R, Martinez C. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann Oncol.* 2010 May;21 Suppl 3:iii30-6.
32. De Angelis R, Francisci S, Baili P, Marchesi F, Roazzi P, Belot A, et al. The EUROCORE-4 database on cancer survival in Europe: data standardisation, quality control and methods of statistical analysis. *Eur J Cancer.* 2009 Apr;45(6):909-30.
33. Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, Gatta G, Micheli A, Mangone L, et al. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EUROCORE-4 data. *Lancet Oncol.* 2007 Sep;8(9):784-96.
34. Sant M, Aareleid T, Berrino F, Bielska Lasota M, Carli PM, Faivre J, et al. EUROCORE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94--results and commentary. *Ann Oncol.* 2003;14 Suppl 5:v61-118.
35. Martinez-Salamanca JI, Martinez Ballesteros C, Carballido Rodriguez J. [Epidemiological fundamentals of clinically localized prostate cancer]. *Arch Esp Urol.* 2011 Oct;64(8):703-10.
36. Clegg LX, Li FP, Hankey BF, Chu K, Edwards BK. Cancer survival among US whites and minorities: a SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) Program population-based study. *Arch Intern Med.* 2002 Sep 23;162(17):1985-93.
37. Bianco FJ, Jr., Wood DP, Jr., Grignon DJ, Sakr WA, Pontes JE, Powell JJ. Prostate cancer stage shift has eliminated the gap in disease-free survival in black and white American men after radical prostatectomy. *J Urol.* 2002 Aug;168(2):479-82.
38. Whittemore AS, Wu AH, Kolonel LN, John EM, Gallagher RP, Howe GR, et al. Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada. *Am J Epidemiol.* 1995 Apr 15;141(8):732-40.
39. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate.* 1990;17(4):337-47.
40. Gronberg H, Damber L, Damber JE. Familial prostate cancer in Sweden. A nationwide register cohort study. *Cancer.* 1996 Jan 1;77(1):138-43.
41. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Apr 15;89(8):3367-71.
42. Bratt O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol.* 2002 Sep;168(3):906-13.
43. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med.* 2000 Jul 13;343(2):78-85.
44. Gronberg H, Damber L, Damber JE, Iselius L. Segregation analysis of prostate cancer in Sweden: support for dominant inheritance. *Am J Epidemiol.* 1997 Oct 1;146(7):552-7.

45. Cui J, Staples MP, Hopper JL, English DR, McCredie MR, Giles GG. Segregation analyses of 1,476 population-based Australian families affected by prostate cancer. *Am J Hum Genet.* 2001 May;68(5):1207-18.
46. Schaid DJ, McDonnell SK, Blute ML, Thibodeau SN. Evidence for autosomal dominant inheritance of prostate cancer. *Am J Hum Genet.* 1998 Jun;62(6):1425-38.
47. Berry R, Schroeder JJ, French AJ, McDonnell SK, Peterson BJ, Cunningham JM, et al. Evidence for a prostate cancer-susceptibility locus on chromosome 20. *Am J Hum Genet.* 2000 Jul;67(1):82-91.
48. Suarez BK, Lin J, Burmester JK, Broman KW, Weber JL, Banerjee TK, et al. A genome screen of multiplex sibships with prostate cancer. *Am J Hum Genet.* 2000 Mar;66(3):933-44.
49. Xu J, Zheng SL, Hawkins GA, Faith DA, Kelly B, Isaacs SD, et al. Linkage and association studies of prostate cancer susceptibility: evidence for linkage at 8p22-23. *Am J Hum Genet.* 2001 Aug;69(2):341-50.
50. Lander ES. The new genomics: global views of biology. *Science.* 1996 Oct 25;274(5287):536-9.
51. Chang BL, Zheng SL, Hawkins GA, Isaacs SD, Wiley KE, Turner A, et al. Polymorphic GGC repeats in the androgen receptor gene are associated with hereditary and sporadic prostate cancer risk. *Hum Genet.* 2002 Feb;110(2):122-9.
52. Lange EM, Chen H, Brierley K, Livermore H, Wojno KJ, Langefeld CD, et al. The polymorphic exon 1 androgen receptor CAG repeat in men with a potential inherited predisposition to prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000 Apr;9(4):439-42.
53. Schmid HP, Engeler DS, Pummer K, Schmitz-Drager BJ. Prevention of prostate cancer: more questions than data. *Recent Results Cancer Res.* 2007;174:101-7.
54. Fleshner N, Bagnell PS, Klotz L, Venkateswaran V. Dietary fat and prostate cancer. *J Urol.* 2004 Feb;171(2 Pt 2):S19-24.
55. Rowlands MA, Holly JM, Gunnell D, Donovan JL, Athene Lane J, Hamdy F, et al. Circulating insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins (IGFBPs) in PSA-detected prostate cancer: the large case control study ProtecT. *Cancer Res.* 2011 Nov 21.
56. Chan JM, Stampfer MJ, Ma J, Gann PH, Gaziano JM, Giovannucci EL. Dairy products, calcium, and prostate cancer risk in the Physicians' Health Study. *Am J Clin Nutr.* 2001 Oct;74(4):549-54.
57. Shirai T, Asamoto M, Takahashi S, Imaida K. Diet and prostate cancer. *Toxicology.* 2002 Dec 27;181-182:89-94.
58. Klein EA, Thompson IM, Jr., Tangen CM, Crowley JJ, Lucia MS, Goodman PJ, et al. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA.* 2011 Oct 12;306(14):1549-56.
59. Lippman SM, Klein EA, Goodman PJ, Lucia MS, Thompson IM, Ford LG, et al. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA.* 2009 Jan 7;301(1):39-51.
60. Hsing AW. Hormones and prostate cancer: what's next? *Epidemiol Rev.* 2001;23(1):42-58.
61. Carvalhal GF, Smith DS, Mager DE, Ramos C, Catalona WJ. Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng./ml. or less. *J Urol.* 1999 Mar;161(3):835-9.
62. Bozeman CB, Carver BS, Caldito G, Venable DD, Eastham JA. Prostate cancer in patients with an abnormal digital rectal examination and serum prostate-specific antigen less than 4.0 ng/mL. *Urology.* 2005 Oct;66(4):803-7.
63. Okotie OT, Roehl KA, Han M, Loeb S, Gashti SN, Catalona WJ. Characteristics of prostate cancer detected by digital rectal examination only. *Urology.* 2007 Dec;70(6):1117-20.
64. Greene KL, Albertsen PC, Babaian RJ, Carter HB, Gann PH, Han M, et al. Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update. *J Urol.* 2009 Nov;182(5):2232-41.

65. Thompson IM, Jr., Leach RJ, Ankerst DP. Prostate cancer detection: a view of the future. *Eur Urol.* 2011 Feb;59(2):191-3.
66. Finne P, Finne R, Bangma C, Hugosson J, Hakama M, Auvinen A, et al. Algorithms based on prostate-specific antigen (PSA), free PSA, digital rectal examination and prostate volume reduce false-positive PSA results in prostate cancer screening. *Int J Cancer.* 2004 Aug 20;111(2):310-5.
67. 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 May 27;350(22):2239-46.
68. Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham JA, Dotan ZA, Bianco FJ, Jr., Lilja H, et al. Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. *J Clin Oncol.* 2006 Aug 20;24(24):3973-8.
69. Gonzalez-Reyes S, Fernandez JM, Gonzalez LO, Aguirre A, Suarez A, Gonzalez JM, et al. Study of TLR3, TLR4, and TLR9 in prostate carcinomas and their association with biochemical recurrence. *Cancer Immunol Immunother.* 2011 Feb;60(2):217-26.
70. 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 Apr 22-29;267(16):2215-20.
71. Moul JW, Sun L, Hotaling JM, Fitzsimons NJ, Polascik TJ, Robertson CN, et al. Age adjusted prostate specific antigen and prostate specific antigen velocity cut points in prostate cancer screening. *J Urol.* 2007 Feb;177(2):499-503; discussion 4.
72. Stephan C, Klaas M, Muller C, Schnorr D, Loening SA, Jung K. Interchangeability of measurements of total and free prostate-specific antigen in serum with 5 frequently used assay combinations: an update. *Clin Chem.* 2006 Jan;52(1):59-64.
73. Moore CK, Karikehalli S, Nazeer T, Fisher HA, Kaufman RP, Jr., Mian BM. Prognostic significance of high grade prostatic intraepithelial neoplasia and atypical small acinar proliferation in the contemporary era. *J Urol.* 2005 Jan;173(1):70-2.
74. Merrimen JL, Jones G, Walker D, Leung CS, Kapusta LR, Srigley JR. Multifocal high grade prostatic intraepithelial neoplasia is a significant risk factor for prostatic adenocarcinoma. *J Urol.* 2009 Aug;182(2):485-90; discussion 90.
75. Kuehhas FE, Djavan B. New findings in prostate cancer: highlights from the 24th annual congress of the European association of urology, march 17-21, 2009, stockholm, sweden. *Rev Urol.* 2009 Summer;11(3):169-72.
76. Ilic D, O'Connor D, Green S, Wilt TJ. Screening for prostate cancer: an updated Cochrane systematic review. *BJU Int.* 2011 Mar;107(6):882-91.
77. Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *Eur Urol.* 2011 Jan;59(1):61-71.
78. Schroder 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 Mar 26;360(13):1320-8.
79. Edger SBB, D.R; Compton, C.C; Fritz, A.G; Greene, F.L; Trotti A. Prostate. In: Springer, editor. *AJCC Cancer Staging Manual.* 7 ed. Chicago 2009.
80. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep.* 1966 Mar;50(3):125-8.
81. Adolfsson J. Watchful waiting and active surveillance: the current position. *BJU Int.* 2008 Jul;102(1):10-4.
82. Klotz L, Zhang L, Lam A, Nam R, Mamedov A, Loblaw A. Clinical results of long-term follow-up of a large, active surveillance cohort with localized prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Jan 1;28(1):126-31.

83. Bill-Axelson A, Holmberg L, Ruutu M, Garmo H, Stark JR, Busch C, et al. Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *N Engl J Med*. 2011 May 5;364(18):1708-17.
84. Briganti A, Chun FK, Salonia A, Gallina A, Farina E, Da Pozzo LF, et al. Validation of a nomogram predicting the probability of lymph node invasion based on the extent of pelvic lymphadenectomy in patients with clinically localized prostate cancer. *BJU Int*. 2006 Oct;98(4):788-93.
85. Ash D, Flynn A, Battermann J, de Reijke T, Lavagnini P, Blank L. ESTRO/EAU/EORTC recommendations on permanent seed implantation for localized prostate cancer. *Radiother Oncol*. 2000 Dec;57(3):315-21.
86. McLeod DG. Hormonal therapy: historical perspective to future directions. *Urology*. 2003 Feb;61(2 Suppl 1):3-7.
87. Anderson J. The role of antiandrogen monotherapy in the treatment of prostate cancer. *BJU Int*. 2003 Mar;91(5):455-61.
88. Moul JW. Twenty years of controversy surrounding combined androgen blockade for advanced prostate cancer. *Cancer*. 2009 Aug 1;115(15):3376-8.
89. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 7;351(15):1502-12.
90. Eiro N, Vizoso FJ. Inflammation and cancer. *World J Gastrointest Surg*. 2012 Mar 27;4(3):62-72.
91. Heidland A, Klassen A, Rutkowski P, Bahner U. The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance? *J Nephrol*. 2006 May-Jun;19 Suppl 10:S102-9.
92. Coussens LM, Zitvogel L, Palucka AK. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science*. 2013 Jan 18;339(6117):286-91.
93. Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Curr Pharm Des*. 2012;18(26):3831-52.
94. Sfanos KS, De Marzo AM. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology*. 2012 Jan;60(1):199-215.
95. Hochreiter WW, Nadler RB, Koch AE, Campbell PL, Ludwig M, Weidner W, et al. Evaluation of the cytokines interleukin 8 and epithelial neutrophil activating peptide 78 as indicators of inflammation in prostatic secretions. *Urology*. 2000 Dec 20;56(6):1025-9.
96. Fujita K, Ewing CM, Sokoll LJ, Elliott DJ, Cunningham M, De Marzo AM, et al. Cytokine profiling of prostatic fluid from cancerous prostate glands identifies cytokines associated with extent of tumor and inflammation. *Prostate*. 2008 Jun 1;68(8):872-82.
97. Sciarra A, Di Silverio F, Salciccia S, Autran Gomez AM, Gentilucci A, Gentile V. Inflammation and chronic prostatic diseases: evidence for a link? *Eur Urol*. 2007 Oct;52(4):964-72.
98. Lorusso G, Rugg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol*. 2008 Dec;130(6):1091-103.
99. Escaff S, Fernandez JM, Gonzalez LO, Suarez A, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez JM, et al. Collagenase-3 expression by tumor cells and gelatinase B expression by stromal fibroblast-like cells are associated with biochemical recurrence after radical prostatectomy in patients with prostate cancer. *World J Urol*. 2011 Oct;29(5):657-63.
100. Fernandez-Gomez J, Escaf S, Gonzalez LO, Suarez A, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez J, et al. Relationship between metalloprotease expression in tumour and stromal cells and aggressive behaviour in prostate carcinoma: Simultaneous high-throughput study of multiple metalloproteases and their inhibitors using tissue array analysis of radical prostatectomy samples. *Scand J Urol Nephrol*. 2011 Apr;45(3):171-6.

101. Escaff S, Fernandez JM, Gonzalez LO, Suarez A, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez JM, et al. Comparative study of stromal metalloproteases expression in patients with benign hyperplasia and prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011 Mar;137(3):551-5.
102. Escaff S, Fernandez JM, Gonzalez LO, Suarez A, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez JM, et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2010 Mar 2;102(5):922-9.
103. Cansino Alcaide JR, Vera San Martin R, Rodriguez de Bethencourt Codes F, Bouraoui Y, Rodriguez Berriguete G, Oueslati R, et al. [Prostatic specific antigen (PS), pro-inflammatory cytokines, and prostatic pathology (benign prostatic hyperplasia and cancer). Relationship with malignancy]. *Arch Esp Urol*. 2009 Jun;62(5):359-66.
104. Eiro N, Gonzalez L, Gonzalez LO, Fernandez-Garcia B, Lamelas ML, Marin L, et al. Relationship between the inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development. *PLoS One*. 2012;7(11):e49047.
105. Eiro N, Pidal I, Fernandez-Garcia B, Junquera S, Lamelas ML, del Casar JM, et al. Impact of CD68/(CD3+CD20) ratio at the invasive front of primary tumors on distant metastasis development in breast cancer. *PLoS One*. 2012;7(12):e52796.
106. Lopez-Otin C, Diamandis EP. Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological, genetic, and biochemical features. *Endocr Rev*. 1998 Aug;19(4):365-96.
107. Dong Z, Greene G, Pettaway C, Dinney CP, Eue I, Lu W, et al. Suppression of angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis by human prostate cancer cells engineered to produce interferon-beta. *Cancer Res*. 1999 Feb 15;59(4):872-9.
108. Cao G, Su J, Lu W, Zhang F, Zhao G, Marteralli D, et al. Adenovirus-mediated interferon-beta gene therapy suppresses growth and metastasis of human prostate cancer in nude mice. *Cancer Gene Ther*. 2001 Jul;8(7):497-505.
109. Chen FF, Jiang G, Xu K, Zheng JN. Function and mechanism by which interferon regulatory factor-1 inhibits oncogenesis. *Oncol Lett*. 2013 Feb;5(2):417-23.
110. Angelucci C, Iacopino F, Ferracuti S, Urbano R, Sica G. Recombinant human IFN-beta affects androgen receptor level, neuroendocrine differentiation, cell adhesion, and motility in prostate cancer cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2007 Aug;27(8):643-52.
111. Mahurkar S, Moldovan M, Suppiah V, O'Doherty C. Identification of shared genes and pathways: a comparative study of multiple sclerosis susceptibility, severity and response to interferon Beta treatment. *PLoS One*. 2013;8(2):e57655.
112. Zhang F, Lu W, Dong Z. Tumor-infiltrating macrophages are involved in suppressing growth and metastasis of human prostate cancer cells by INF-beta gene therapy in nude mice. *Clin Cancer Res*. 2002 Sep;8(9):2942-51.
113. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986 Aug 29;46(5):705-16.
114. Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997 Jul;17(1):3-9.
115. Mimeault M, Johansson SL, Batra SK. Pathobiological implications of the expression of EGFR, pAkt, NF-kappaB and MIC-1 in prostate cancer stem cells and their progenies. *PLoS One*. 2012;7(2):e31919.
116. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006 Oct 30;25(51):6680-4.
117. Zingarelli B. Nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med*. 2005 Dec;33(12 Suppl):S414-6.
118. Sheikh MS, Huang Y. Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1. *Cell Cycle*. 2003 Nov-Dec;2(6):550-2.
119. Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, Mauri C, Bicknell C, Foxwell B, et al. Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and

- prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 13;101(15):5634-9.
120. Cai Y, Wang J, Ren C, Ittmann M. Frequent heterogeneous missense mutations of GGAP2 in prostate cancer: implications for tumor biology, clonality and mutation analysis. *PLoS One*. 2012;7(2):e32708.
121. Escarcega RO, Fuentes-Alexandro S, Garcia-Carrasco M, Gatica A, Zamora A. The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2007 Mar;19(2):154-61.
122. Gannon PO, Lessard L, Stevens LM, Forest V, Begin LR, Minner S, et al. Large-scale independent validation of the nuclear factor-kappa B p65 prognostic biomarker in prostate cancer. *Eur J Cancer*. 2013 Mar 27.
123. Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J Transl Med*. 2006;4:48.
124. Ricote M, Garcia-Tunon I, Bethencourt FR, Fraile B, Paniagua R, Royuela M. Interleukin-1 (IL-1alpha and IL-1beta) and its receptors (IL-1RI, IL-1RII, and IL-1Ra) in prostate carcinoma. *Cancer*. 2004 Apr 1;100(7):1388-96.
125. Portier M, Zhang XG, Ursule E, Lees D, Jourdan M, Bataille R, et al. Cytokine gene expression in human multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1993 Nov;85(3):514-20.
126. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996 Mar 15;87(6):2095-147.
127. Schulze J, Weber K, Baranowsky A, Streichert T, Lange T, Spiro AS, et al. p65-Dependent production of interleukin-1beta by osteolytic prostate cancer cells causes an induction of chemokine expression in osteoblasts. *Cancer Lett*. 2012 Apr 1;317(1):106-13.
128. Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med*. 2008 Mar;14(3):109-19.
129. Magalhaes JF, Cortinhas AJ, Albuquerque CM, Baptista CS, Ribeiro R, Viegas C, et al. Interleukin-6 gene -174G>C and -636G>C promoter polymorphisms and prostate cancer risk. *Mol Biol Rep*. 2013 Jan;40(1):449-55.
130. Tindall EA, Severi G, Hoang HN, Southey MC, English DR, Hopper JL, et al. Interleukin-6 promoter variants, prostate cancer risk, and survival. *Prostate*. 2012 Dec 1;72(16):1701-7.
131. Zhang H, Xu Y, Li L, Liu R, Ma B. The interleukin-6 -174G/C polymorphism and prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Urol Int*. 2012;88(4):447-53.
132. Rodriguez-Berriguete G, Prieto A, Fraile B, Bouraoui Y, de Bethencourt FR, Martinez-Onsurbe P, et al. Relationship between IL-6/ERK and NF-kappaB: a study in normal and pathological human prostate gland. *Eur Cytokine Netw*. 2010 Dec;21(4):241-50.
133. Terracciano D, Bruzzese D, Ferro M, Autorino R, di Lorenzo G, Buonerba C, et al. Soluble interleukin-6 receptor to interleukin-6 (sIL6R/IL-6) ratio in serum as a predictor of high Gleason sum at radical prostatectomy. *Oncol Lett*. 2011 Sep 1;2(5):861-4.
134. Kinoshita Y, Kono T, Yasumoto R, Kishimoto T, Wang CY, Haas GP, et al. Antitumor effect on murine renal cell carcinoma by autologous tumor vaccines genetically modified with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 cells. *J Immunother*. 2001 May-Jun;24(3):205-11.
135. O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jun;7(6):425-8.
136. Zou YF, Wang F, Feng XL, Tian YH, Tao JH, Pan FM, et al. Lack of association of IL-10 gene polymorphisms with prostate cancer: evidence from 11,581 subjects. *Eur J Cancer*. 2011 May;47(7):1072-9.

137. Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation*. 2003 Mar 15;75(5):711-7.
138. Steinke JW, Barekzi E, Huyett P, Borish L. Differential interleukin-10 production stratified by -571 promoter polymorphism in purified human immune cells. *Cell Immunol*. 2007 Oct;249(2):101-7.
139. Steinke JW, Barekzi E, Hagman J, Borish L. Functional analysis of -571 IL-10 promoter polymorphism reveals a repressor element controlled by sp1. *J Immunol*. 2004 Sep 1;173(5):3215-22.
140. Faupel-Badger JM, Kidd LC, Albanes D, Virtamo J, Woodson K, Tangrea JA. Association of IL-10 polymorphisms with prostate cancer risk and grade of disease. *Cancer Causes Control*. 2008 Mar;19(2):119-24.
141. Dluzniewski PJ, Wang MH, Zheng SL, De Marzo AM, Drake CG, Fedor HL, et al. Variation in IL10 and other genes involved in the immune response and in oxidation and prostate cancer recurrence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Oct;21(10):1774-82.
142. Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol*. 2005 Nov;78(5):1043-51.
143. Vykhoanets EV, Maclennan GT, Vykhoanets OV, Gupta S. IL-17 Expression by macrophages is associated with proliferative inflammatory atrophy lesions in prostate cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011 Aug 15;4(6):552-65.
144. You Z, Shi XB, DuRaine G, Haudenschild D, Tepper CG, Lo SH, et al. Interleukin-17 receptor-like gene is a novel antiapoptotic gene highly expressed in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res*. 2006 Jan 1;66(1):175-83.
145. Steiner GE, Newman ME, Paikl D, Stix U, Memaran-Dagda N, Lee C, et al. Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate*. 2003 Aug 1;56(3):171-82.
146. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):479-89.
147. Zhang Q, Liu S, Ge D, Xue Y, Xiong Z, Abdel-Mageed AB, et al. Interleukin-17 promotes formation and growth of prostate adenocarcinoma in mouse models. *Cancer Res*. 2012 May 15;72(10):2589-99.
148. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*. 2003 Apr 1;101(7):2620-7.
149. Wang L, Yi T, Zhang W, Pardoll DM, Yu H. IL-17 enhances tumor development in carcinogen-induced skin cancer. *Cancer Res*. 2010 Dec 15;70(24):10112-20.
150. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med*. 2009 Sep;15(9):1016-22.
151. Zha S, Gage WR, Sauvageot J, Saria EA, Putzi MJ, Ewing CM, et al. Cyclooxygenase-2 is up-regulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate, but not in prostate carcinoma. *Cancer Res*. 2001 Dec 15;61(24):8617-23.
152. Kaplan SA. Chronic Inflammation in Benign Prostate Hyperplasia is Associated With Focal Upregulation of Cyclooxygenase-2, Bcl-2, and Cell Proliferation in the Glandular Epithelium. *J Urol*. 2005 Apr;173(4):1266-7.
153. Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, Xu L, Thoburn CJ, DeMarzo AM, et al. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res*. 2008 Jun 1;14(11):3254-61.
154. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):467-76.



155. Narayanan NK, Nargi D, Horton L, Reddy BS, Bosland MC, Narayanan BA. Inflammatory processes of prostate tissue microenvironment drive rat prostate carcinogenesis: preventive effects of celecoxib. *Prostate*. 2009 Feb 1;69(2):133-41.
156. Vykhovanets EV, Shukla S, MacLennan GT, Vykhovanets OV, Bodner DR, Gupta S. Il-1 beta-induced post-transition effect of NF-kappaB provides time-dependent wave of signals for initial phase of intrapostatic inflammation. *Prostate*. 2009 May 1;69(6):633-43.
157. Sobin LH, Fleming ID. TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer*. 1997 Nov 1;80(9):1803-4.
158. Hughes C, Murphy A, Martin C, Sheils O, O'Leary J. Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol*. 2005 Jul;58(7):673-84.
159. Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev*. 2000 Oct 1;14(19):2410-34.
160. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jul 24;349(4):366-81.
161. Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2003 Sep 1;417(1):3-11.
162. Boorjian SA, Eastham JA, Graefen M, Guillonneau B, Karnes RJ, Moul JW, et al. A critical analysis of the long-term impact of radical prostatectomy on cancer control and function outcomes. *Eur Urol*. 2012 Apr;61(4):664-75.
163. Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Sep;25(3):315-22.
164. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jan;4(1):71-8.
165. Noemí Eiró, Sandra Bermudez-Fernandez, Belen Fernandez-Garcia, Sara Atienza, Nana Beridze, Safwan Escaf, Francisco J Vizoso. Analysis of the expression of Interleukins, Interferon  $\beta$  and Nuclear Factor kappa B in prostate cancer and their relationship with biochemical recurrence. *Journal of Immunotherapy*. 2014;in press.
166. Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell*. 2010 Feb 17;17(2):135-47.
167. Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Nov 3;96(21):1593-603.
168. Nunez NG, Andreani V, Crespo MI, Nocera DA, Breser ML, Moron G, et al. IFNbeta produced by TLR4-activated tumor cells is involved in improving the antitumoral immune response. *Cancer Res*. 2012 Feb 1;72(3):592-603.
169. Schmeisser H, Fey SB, Horowitz J, Fischer ER, Balinsky CA, Miyake K, et al. Type I interferons induce autophagy in certain human cancer cell lines. *Autophagy*. 2013 May 1;9(5):683-96.
170. Chiantore MV, Vannucchi S, Accardi R, Tommasino M, Percario ZA, Vaccari G, et al. Interferon-beta induces cellular senescence in cutaneous human papilloma virus-transformed human keratinocytes by affecting p53 transactivating activity. *PLoS One*. 2012;7(5):e36909.
171. Madar S, Harel E, Goldstein I, Stein Y, Kogan-Sakin I, Kamer I, et al. Mutant p53 Attenuates the Anti-Tumorigenic Activity of Fibroblasts-Secreted Interferon Beta. *PLoS One*. 2013;8(4):e61353.
172. Oh SS, Moon C, Kim DH, Song H, Park S, Fu Y, et al. Adenovirally delivered IFN-beta exerts antitumor effects through transient T-lymphocyte depletion and Ag-specific T-cell proliferation. *Int J Mol Med*. 2012 Jun;29(6):1153-7.

173. Kasza A. IL-1 and EGF regulate expression of genes important in inflammation and cancer. *Cytokine*. 2013 Apr;62(1):22-33.
174. Carmi Y, Dotan S, Rider P, Kaplanov I, White MR, Baron R, et al. The role of IL-1beta in the early tumor cell-induced angiogenic response. *J Immunol*. 2013 Apr 1;190(7):3500-9.
175. Apte RN, Voronov E. Interleukin-1--a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. *Semin Cancer Biol*. 2002 Aug;12(4):277-90.
176. Li Y, Wang L, Pappan L, Galliher-Beckley A, Shi J. IL-1beta promotes stemness and invasiveness of colon cancer cells through Zeb1 activation. *Mol Cancer*. 2012;11:87.
177. Schauer IG, Zhang J, Xing Z, Guo X, Mercado-Urbe I, Sood AK, et al. Interleukin-1beta promotes ovarian tumorigenesis through a p53/NF-kappaB-mediated inflammatory response in stromal fibroblasts. *Neoplasia*. 2013 Apr;15(4):409-20.
178. Liu Q, Russell MR, Shahriari K, Jernigan DL, Lioni MI, Garcia FU, et al. Interleukin-1beta promotes skeletal colonization and progression of metastatic prostate cancer cells with neuroendocrine features. *Cancer Res*. 2013 Jun 1;73(11):3297-305.
179. Culig Z. Cytokine disbalance in common human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Feb;1813(2):308-14.
180. Garnero P, Thompson E, Woodworth T, Smolen JS. Rapid and sustained improvement in bone and cartilage turnover markers with the anti-interleukin-6 receptor inhibitor tocilizumab plus methotrexate in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate: results from a substudy of the multicenter double-blind, placebo-controlled trial of tocilizumab in inadequate responders to methotrexate alone. *Arthritis Rheum*. 2010 Jan;62(1):33-43.
181. Nakashima Y, Kondo M, Harada H, Horiuchi T, Ishinishi T, Jojima H, et al. Clinical evaluation of tocilizumab for patients with active rheumatoid arthritis refractory to anti-TNF biologics: tocilizumab in combination with methotrexate. *Mod Rheumatol*. 2010 Aug;20(4):343-52.
182. Dorff TB, Goldman B, Pinski JK, Mack PC, Lara PN, Jr., Van Veldhuizen PJ, Jr., et al. Clinical and correlative results of SWOG S0354: a phase II trial of CNTO328 (siltuximab), a monoclonal antibody against interleukin-6, in chemotherapy-pretreated patients with castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Jun 1;16(11):3028-34.
183. Wallner L, Dai J, Escara-Wilke J, Zhang J, Yao Z, Lu Y, et al. Inhibition of interleukin-6 with CNTO328, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, inhibits conversion of androgen-dependent prostate cancer to an androgen-independent phenotype in orchietomized mice. *Cancer Res*. 2006 Mar 15;66(6):3087-95.
184. Hedvat M, Huszar D, Herrmann A, Gozgit JM, Schroeder A, Sheehy A, et al. The JAK2 inhibitor AZD1480 potently blocks Stat3 signaling and oncogenesis in solid tumors. *Cancer Cell*. 2009 Dec 8;16(6):487-97.
185. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):546-58.
186. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Munoz-Suano A, Kamanaka M, et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol*. 2011 May 15;186(10):5569-79.
187. Chang EY, Guo B, Doyle SE, Cheng G. Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. *J Immunol*. 2007 Jun 1;178(11):6705-9.
188. Guo B, Chang EY, Cheng G. The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *J Clin Invest*. 2008 May;118(5):1680-90.

189. Prinz M, Schmidt H, Mildner A, Knobloch KP, Hanisch UK, Raasch J, et al. Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity*. 2008 May;28(5):675-86.
190. Shinohara ML, Kim JH, Garcia VA, Cantor H. Engagement of the type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development: role of intracellular osteopontin. *Immunity*. 2008 Jul 18;29(1):68-78.
191. Zhang L, Yuan S, Cheng G, Guo B. Type I IFN promotes IL-10 production from T cells to suppress Th17 cells and Th17-associated autoimmune inflammation. *PLoS One*. 2011;6(12):e28432.
192. Bouraoui Y, Ben Rais N, Culig Z, Oueslati R. Involvement of interleukin-1beta mediated nuclear factor kappaB signalling pathways to down-regulate prostate-specific antigen and cell proliferation in LNCaP prostate cancer cells. *Cell Biol Int*. 2012 May 1;36(5):449-54.
193. Huangfu WC, Qian J, Liu C, Liu J, Lokshin AE, Baker DP, et al. Inflammatory signaling compromises cell responses to interferon alpha. *Oncogene*. 2012 Jan 12;31(2):161-72.

