

Universidad de Oviedo

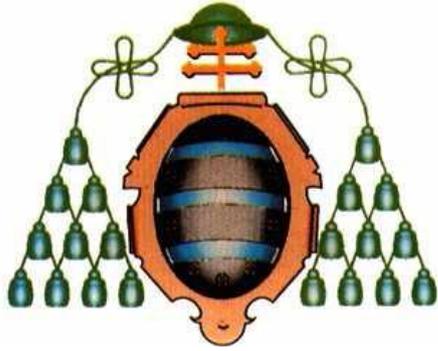
Máster en Investigación en Medicina

“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 2012

Trabajo Fin de Máster



Universidad de Oviedo

Máster en Investigación en Medicina

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

Trabajo Fin de Máster

Autora

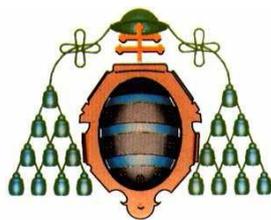
Director

Tutor

Sandra Bermúdez Fernández

Dr. Francisco J. Vizoso

Prof. Manuel F. Fresno



Manuel Florentino Fresno Forcelledo, Doctor en Medicina por la Universidad de Oviedo, Catedrático de Anatomía-Patológica del Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas del Hospital Universitario Central de Asturias, y Profesor del Máster Investigación en Medicina por la Universidad de Oviedo.

Francisco José Vizoso Piñeiro, Doctor en Medicina por la Universidad de Oviedo, Jefe de la Unidad de Investigación de la Fundación Hospital de Jove.

CERTIFICAN:

Que el Trabajo Fin de Máster presentado por Dña. Sandra Bermúdez Fernández, titulado “Expresión diferencial y significación clínica de las proteínas relacionadas con la inflamación en la hiperplasia benigna prostática y en el cáncer de próstata”, realizado bajo la dirección del Dr. Francisco J. Vizoso dentro del Máster en Investigación en Medicina por la Universidad de Oviedo, reúne a nuestro juicio las condiciones necesarias para ser admitido como Trabajo Fin de Máster en la Universidad de Oviedo.

Y para que así conste dónde convenga, firman la presente certificación en Oviedo a 07 de Junio de 2012.

Vº Bº

VºBº

Fdo. Dr. Francisco J. Vizoso

Fdo. Prof. Manuel F. Fresno

Director del Proyecto

Tutor del Proyecto

Índice

Agradecimientos	1
Introducción.....	3
<i>1. La Próstata</i>	<i>4</i>
<i>1.1. Situación y relaciones.....</i>	<i>4</i>
<i>1.2 Estructura</i>	<i>4</i>
<i>2. Hiperplasia benigna prostática</i>	<i>5</i>
<i>3. Epidemiología del cáncer de próstata.....</i>	<i>6</i>
<i>3.1. Conceptos generales.....</i>	<i>6</i>
<i>3.2 Incidencia y mortalidad.....</i>	<i>7</i>
<i>3.3 Supervivencia de los pacientes con cáncer de próstata</i>	<i>7</i>
<i>4. Factores de riesgo para el cáncer de próstata</i>	<i>8</i>
<i>4.1 Edad</i>	<i>8</i>
<i>4.2 Raza.....</i>	<i>8</i>
<i>4.3 Factores genéticos.....</i>	<i>9</i>
<i>4.5 Hormonas</i>	<i>10</i>
<i>5. Diagnóstico.....</i>	<i>10</i>
<i>5.1 Tacto rectal (TR).....</i>	<i>10</i>
<i>5.2 Antígeno prostático específico (PSA).....</i>	<i>11</i>
<i>5.2.1 Velocidad de PSA</i>	<i>12</i>
<i>5.3 Biopsia prostática</i>	<i>13</i>
<i>6. Screening del cáncer de próstata.....</i>	<i>13</i>
<i>7. Estadíaje.....</i>	<i>14</i>
<i>7.1 Clasificación TNM</i>	<i>14</i>
<i>7.2 Puntuación de Gleason.....</i>	<i>14</i>
<i>8. Inflamación y cáncer.....</i>	<i>14</i>
<i>8.1 Interferon-β.....</i>	<i>16</i>

8.2 IL- 1 β	16
8.3 NF κ B.....	18
Hipótesis y Objetivos	19
Pacientes y Métodos	22
1. Consideraciones éticas.....	23
2. Selección de pacientes.....	23
3. Elaboración de mallas de tejido y tinción inmunohistoquímica.....	26
4. Análisis de la tinción tisular.....	29
5. Análisis estadístico.....	31
Resultados	32
1. Casos perdidos.....	33
2. Expresión global de IFN β , IL-1 β y NF κ B en la HBP y en el CaP.....	34
3. Expresión de IFN β , IL-1 β y NF κ B por los distintos tipos celulares	38
4. Relación de la expresión simultánea de IFN β , IL-1 β y NF κ B	40
5. Relación de la expresión de los factores con las características clínico-patológicas de los pacientes.....	45
6. Relación de la expresión de los factores a estudio con la recurrencia bioquímica.....	52
7. Relación de la expresión de los factores a estudio con la supervivencia de los pacientes	54
Discusión	56
Conclusiones	62
Bibliografía	64

Agradecimientos

Me gustaría expresar mis agradecimientos al Dr. Francisco J. Vizoso, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo, y enseñarme a transmitir de la forma más correcta posible el contenido de este trabajo. Al Prof. Manuel F. Fresno por aceptar ser el tutor de este trabajo.

También me gustaría mostrar mis agradecimientos, de una forma muy especial, a Noemí Eiró, por haberme enseñado, guiado y compartido la realización de este proyecto. Pero sobre todo, por haberme apoyado en los momentos más tensos, y por estar siempre dispuesta a ayudar con una sonrisa. A Sara Atienza, por haberme explicado los pasos a seguir en el laboratorio y haberme ayudado en la realización de las tinciones inmunohistoquímicas; pero sobre todo, por estar también siempre dispuesta a ayudar.

Agradecer al Dr. Luis Ovidio González y a la Dra. Nana Beridze sus análisis anatomopatológicos.

Así mismo, quisiera agradecer a la Unidad de Investigación de la Fundación Hospital de Jove, su grata acogida y el cariño con el que me han tratado; así como el fomentar un agradable ambiente en el lugar de trabajo. Porque sin su estimada ayuda, la realización de este proyecto de investigación no habría sido posible.

A Jorge García, por su ayuda en todo momento, su paciencia, sus ánimos y por ser mi mayor motivación.

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 3,5-4cm, diámetro anteroposterior de 2 cm, y altura de 3-3,5 cm) (1).

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 (2).

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. 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 (3).

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 hipertrofia benigna de próstata HBP, y se estima que el 20% de los adenocarcinomas de la próstata se originan en ella (4) .

Los elementos glandulares, cuyos conductos se encuentran en la zona central de la uretra, alrededor de los oficios 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 (4).

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

La hiperplasia benigna prostática (HBP) 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 (5).

La HBP es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento histológico de la glándula prostática, que produce una obstrucción al flujo de salida urinario, dando lugar a los denominados síntomas del tracto urinario inferior (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 (6).

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 como un factor añadido de desarrollo y progresión de la HBP (7-9).

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 (10).

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 (11). La mayor incidencia de CaP se

registra en EEUU, Canadá y países escandinavos, y la menor en China y otros países asiáticos (12).

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 (10).

3.2 Incidencia y mortalidad

La incidencia a nivel mundial del CaP es del 25,3 por cada 100.000 hombres (13). 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% (14).

En España su incidencia ha disminuido en los últimos años, encontrándose en aproximadamente 56 casos por 100.000 habitantes. 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 habrá 30.000 nuevos diagnósticos de CaP y 5.500 muertes debidas a esta patología (15, 16).

3.3 Supervivencia de los pacientes con cáncer de próstata

El estudio EURO CARE-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 (17, 18). 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 (19).

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 (20).

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 (20).

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 (21).

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 (22).

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 (23).

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 (24, 25). 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 (26). Los pacientes con CaP hereditario suelen tener un comienzo 6-7 años antes que los casos espontáneos, pero no difieren en otros sentidos (27).

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, el consumo de frutas y verduras, minerales (calcio, selenio) y fitoestrógenos (isoflavonoides, flavonoides, lignanos) (28, 29). Un exceso de estos

alimentos, influye en la activación o inhibición de determinados factores que intervienen en la homeostasis, controlando la proliferación celular.

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 5α -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, es un tratamiento establecido en el CaP avanzado (30).

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 (31, 32).

Se trata de una prueba con mucha variabilidad inter-examinador y con bajo valor predictivo positivo para la detección del CaP (33).

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 hipertrofia benigna de próstata (HBP), prostatitis y otras enfermedades no malignas (34).

En sangre el PSA puede circular de forma libre (PSA libre) o bien unido a proteínas, alfa-1 antitripsina (PSA complex) 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 (35).

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

EDAD (años)	PSA total (ng/ml)
< 49	0-2,4
50-59	0-3,4
60-69	0-5,4
>70	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 (36).

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 0,4 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 (37).

5.2.1 Velocidad de PSA

Es el incremento anual absoluto del PSA sérico (ng/ml/año) (38). Un incremento del PSA > 0,75mg/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.

5.3 Biopsia prostática

El método diagnóstico confirmatorio de elección para el CaP es la biopsia sistematizada por vía transrectal y bajo control ecográfico. Además la ETR también resulta de utilidad para evaluar la presencia de lesiones tumorales en la glándula prostática, así como para valorar su extensión, el volumen de la próstata y calcular la densidad de PSA (PSA/volumen glándula).

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 (39).

6. Screening del cáncer de próstata

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 (40).

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 (41).

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 (41, 42):

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. 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 l de proteínas cruciales implicadas en el ciclo celular, reparación del ADN y la apoptosis (43).

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 (44).

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 (45).

Existen evidencias que apoyan el papel de la inflamación en el CaP. Así, se encontraron altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias en las muestras de tejido prostático y en el semen de los pacientes con prostatitis crónica (46); así como en el líquido prostático recogido de las prostatectomías (47). También se han identificado componentes de bacterias y virus en muestras patológicas de los hombres con CaP. 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 *Toll-like* (TLRs) (45). Por otra parte, los niveles de diferentes interleuquinas (IL), como la IL-1 y la IL-6, así como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), podrían estar asociados con la inflamación, los elevados niveles séricos de PSA y la progresión tumoral (48). La inhibición de estas citoquinas podría ser una posible diana terapéutica en el tratamiento del CaP.

Sin embargo, hasta que no se comprenda mejor la carcinogénesis prostática, el verdadero impacto global de la inflamación en el CaP continúa siendo difícil de alcanzar.

8.1 Interferon- β

Los interferones (IFNs) son una familia de glicoproteínas naturales a la que pertenece el IFN- α , IFN- β e IFN- γ . La actividad antivírica del IFN condujo a su descubrimiento, pero más tarde los estudios revelaron que por inducción de la diferenciación, la fase de acumulación y la apoptosis, el IFN- β , puede inhibir directamente el crecimiento de las células tumorales. También inhibe la expresión de oncogenes y activa a los linfocitos T, las células *natural killer* (NK) y a los macrófagos. Además el IFN- β es capaz de inhibir el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis indirectamente, a través de la activación del óxido nítrico (NO) (49, 50).

El IFN- β también contribuye a la regulación al alza de los receptores androgénicos en el CaP (51). Estos estudios apoyan firmemente el potencial efecto terapéutico del IFN- β en el CaP metastásico hormono-refractario.

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

8.2 IL- 1 β

La familia de la IL-1 está compuesta por dos factores (IL-1 α e IL-1 β), dos receptores transmembrana (IL-1RI e IL-1RII) y el receptor antagonista IL-1Ra. La IL-1 α se localiza en la membrana celular o en el citosol, y se cree que regula el medio intracelular. Por otra parte, la IL-1 β es utilizada por la enzima convertidora de IL-1 β (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-1 β , pero no de IL-1 α , lo que sugiere la función sistémica de la IL-1 β (52).

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 (52).

La expresión de la familia de IL-1 ha sido estudiada en diferentes tumores, entre ellos el CaP, en el que Ricote y cols. proponen que la familia de la IL-1 podría estar relacionada con la proliferación celular, pues la expresión de IL-1 α e IL-1Ra es característica en CaP comparado con próstata normal y HBP (53).

Las células tumorales producen directa o indirectamente IL-1 β (54). Diferentes estudios han documentado que la proteína IL-1 β produce, tanto en humanos como en animales, diferentes líneas celulares que incluyen sarcomas, tumores ováricos, y células carcinomatosas transicionales (55). Ejemplos de tumores sólidos en los cuales la expresión de IL-1 β se encuentra elevada son los de mama, colon, pulmón, cabeza, cuello y melanomas. Además, estos pacientes con sobre-expresión de IL-1 β tumoral, tienen peor pronóstico.

8.3 NFκB

El factor nuclear kappa (NFκB), es un factor de transcripción, una proteína identificada por primera vez por Sen y Baltimore (56). 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 (57). En la tabla 2, se muestran las citoquinas reguladas por el NFκB.

Tabla 2: Citoquinas humanas reguladas por NFκB.

Factores Necrosis Tumoral	Interleuquinas	Quimioquinas	Factores Estimuladores de colonias	Interferones
TNF- α	IL-1 β	IL-8	G-CSF	INF- β
TNF- β	IL-2	Gro α , β , γ	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 α (péptido α 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).

Las vías en las que interviene el NFκB, han sido identificadas como vías críticas en la iniciación y progresión del cáncer en humanos, incluyendo el cáncer de próstata (58).

Hipótesis y Objetivos

Los factores inflamatorios que actúan sobre la glándula prostática se han relacionado con un mayor riesgo de malignización de la misma.

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 β , la IL-1 β y el NF κ B, 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 1.000 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 β , IL-1 β y NF κ B) 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

El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Fundación Hospital de Jove.

2. Selección de pacientes

En este estudio se analizan las muestras procedentes de la biopsia prostática de 50 pacientes afectos de HBP, entre los años 2003 y 2007. También se analizan las muestras procedentes de la intervención quirúrgica prostática de 118 pacientes afectos de CaP, entre los años 1999 y 2005.

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 3 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 3: Características basales de los 50 pacientes con HBP.

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

Las principales características de los pacientes con CaP, respecto a edad, estadio tumoral, score de Gleason y nivel de PSA (ng/ml) previo a la biopsia diagnóstica, están representadas en la Tabla 4.

Tabla 4: Características basales de los 118 pacientes con carcinoma prostático.

Características	No recurrencia bioquímica (n= 78) N° (%)	Recurrencia bioquímica (n= 40) N° (%)
Edad (años)		
≤ 67	45 (57,7)	16 (40)
> 67	33 (42,3)	24 (60)
Estadio tumoral		
T2	72 (92,3)	24 (60)
T3-4	6 (7,7)	16 (40)
Score de Gleason		
2-4	27 (34,6)	12 (30)
5-6	40 (51,3)	18 (45)
7-10	11 (14,1)	10 (25)
PSA (ng/ml)		
≤ 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 β , la IL-1 β y el NF κ B, 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 μ m, siendo posteriormente teñidos con hematoxilina-eosina para seleccionar las zonas hiperplásicas y tumorales más representativas. 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 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 1: (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 β , IL-1 β y NF κ B.

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 siguiendo estos pasos: 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 5); 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.

Tabla 5: Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas mediante inmunohistoquímica.

Anticuerpo primario	Recuperación antigénica	Dilución del anticuerpo	Tiempo incubación	Referencia	Linker	Guardado
IFNβ	pH9	1:400	60´	T3236 EPITOMICS	NO	-20°C
IL-1β	Ph6	1:400	120´	NB600-633 Bionova	NO	-20°C
NFκB	pH9	1:600	60´	1546-1 EPITOMICS	NO	-20°C

4. Análisis de la tinción tisular

Se ha estudiado la localización de la inmunoreactividad 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 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 2), 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.

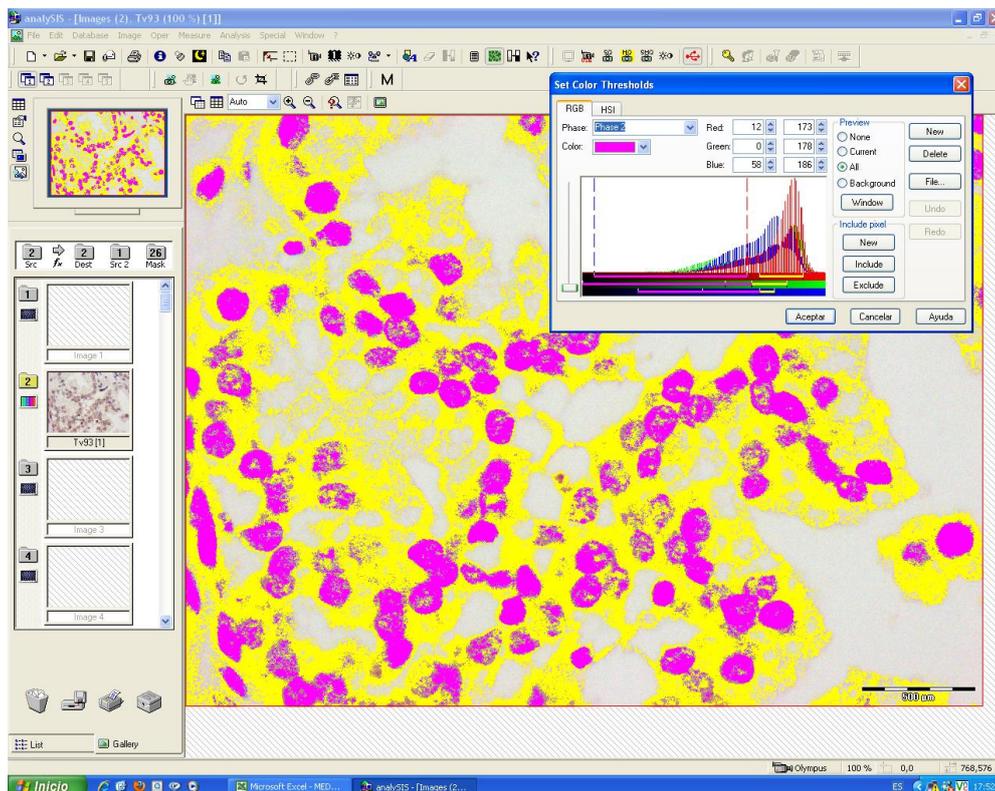


Figura 2: Sistema de tinción y análisis de imagen.

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. 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.

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

Resultados

1. Casos perdidos

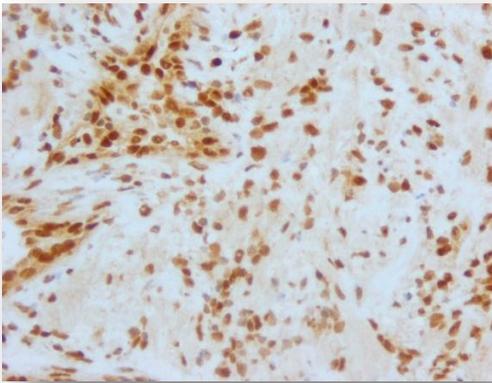
A lo largo de la realización de este estudio, en unos pocos casos, no hemos podido obtener resultados de las tinciones inmunohistoquímicas para los tres factores analizados. Ello ha sido debido a la ausencia de muestra tisular suficiente para realizar todas las determinaciones. A estos resultados los 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 6 se enumeran los casos perdidos para cada determinación.

Tabla 6: Casos perdidos del estudio.

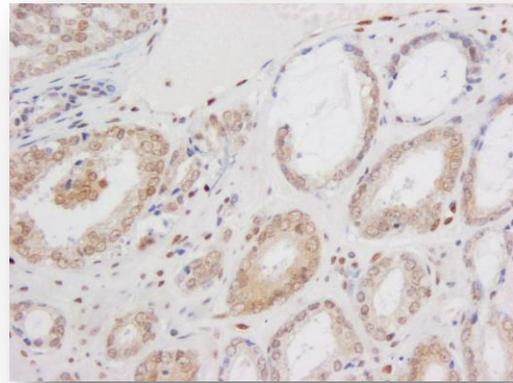
	HBP		Cáncer Próstata	
	Válidos	Perdidos	Válidos	Perdidos
IFNβ	50	6	118	14
IL-1β	50	9	118	12
NFκB	50	7	118	12

2. Expresión global de IFN β , IL-1 β y NF κ B en la HBP y en el CaP

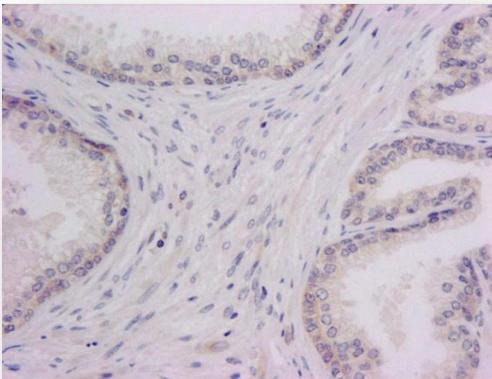
Uno de los objetivos de este estudio ha sido determinar la expresión global (*score*) de los factores cuyo análisis hemos llevado a cabo, tanto en tejido hiperplásico prostático como en tejido tumoral. En la Figura 3, podemos observar de forma comparativa la diferente expresión de tinción del IFN β , IL-1 β y NF κ B, 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, los fibroblastos y las células mononucleares inflamatorias, en ambos grupos de pacientes. En azul observamos teñidos los núcleos de los distintos tipos celulares.



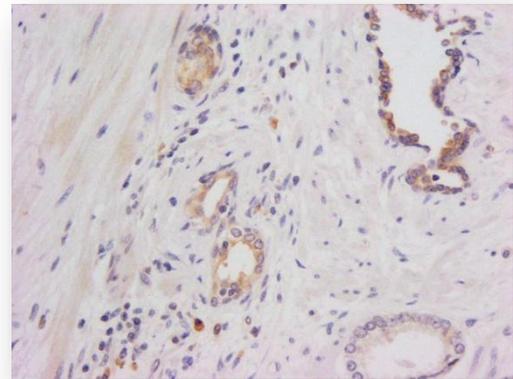
A) IFN β en HBP (200x)



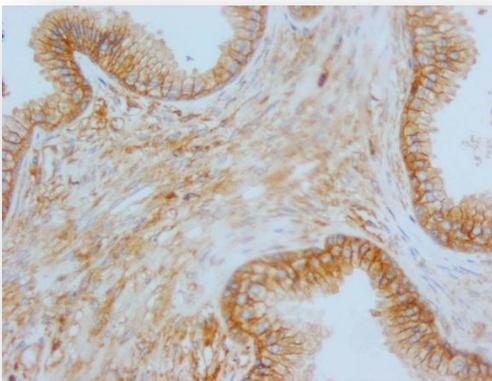
B) IFN β en CaP (200x)



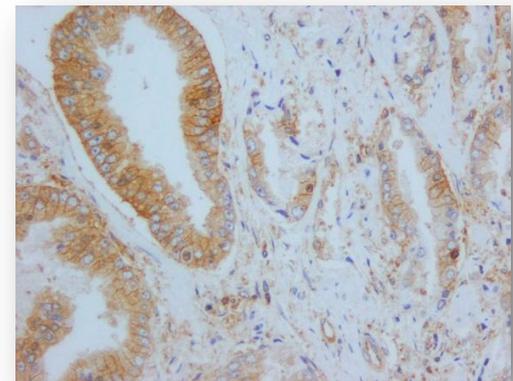
C) IL-1 β en la HBP (200x)



D) IL-1 β en el CaP (200x)



E) NFκB en la HBP (200x)



F) NFκB en el CaP (200x)

Figura 3: Tinción de tejido prostático hiperplásico y tumoral para el IFN β , la IL-1 β y el NFκB.

En la Tabla 7, hemos definido la expresión global de los tres factores a estudio en función de su mediana, describiendo también un intervalo mínimo y máximo de su expresión. Podemos observar que la expresión de la tinción de IFN β es notablemente superior en los pacientes con HBP, mientras que la de IL-1 β es mayor en aquellos con CaP. Sin embargo, la expresión de la tinción del NF κ B resulta similar tanto en la HBP como en el CaP.

Este hallazgo nos ha llevado a la utilización de test estadísticos no paramétricos (U de Mann Whitney para muestras independientes), que nos han establecido una diferencia estadísticamente significativa a través del valor de p que observamos en la tabla, para la distribución de la expresión de la tinción de IFN β e IL-1 β , entre el tejido prostático hiperplásico y el tumoral.

Como podemos observar en la tabla 7, resulta llamativo el hecho de que existen muestras tisulares de tumores en los que no ha habido expresión alguna de los factores a estudio; mientras que en todas las muestras de tejido hiperplásico siempre hemos encontrado cierta expresión de los mismos.

Tabla 7: Expresión global de $IFN\beta$, $IL-1\beta$ y $NF\kappa B$ en tejido inflamatorio prostático y en tejido tumoral prostático.

	HBP			Cáncer Próstata			Valor de p
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
$IFN\beta$	254,01	151,9	285,06	187,38	0	575,76	0,047
$IL-1\beta$	103,98	43,58	159,58	152,27	0	274,23	< 0,0001
$NF\kappa B$	254,58	166,52	279,99	252,45	0	283,11	0,686

3. Expresión de IFN β , IL-1 β y NF κ B 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), los fibroblastos y las células mononucleares inflamatorias; tanto en el tejido hiperplásico prostático como en el tumoral.

Como podemos observar en la tabla 8, la expresión para cada factor en función del tipo celular resulta muy similar, tanto en la HBP como en el CaP, no pudiendo establecerse diferencias estadísticamente significativas.

Asimismo, hemos comprobado que, de los 118 pacientes con CaP, existen 12 casos en los que, de forma conjunta y simultánea, ningún tipo celular expresa ninguno de los factores a estudio (IFN β , IL-1 β , NF κ B).

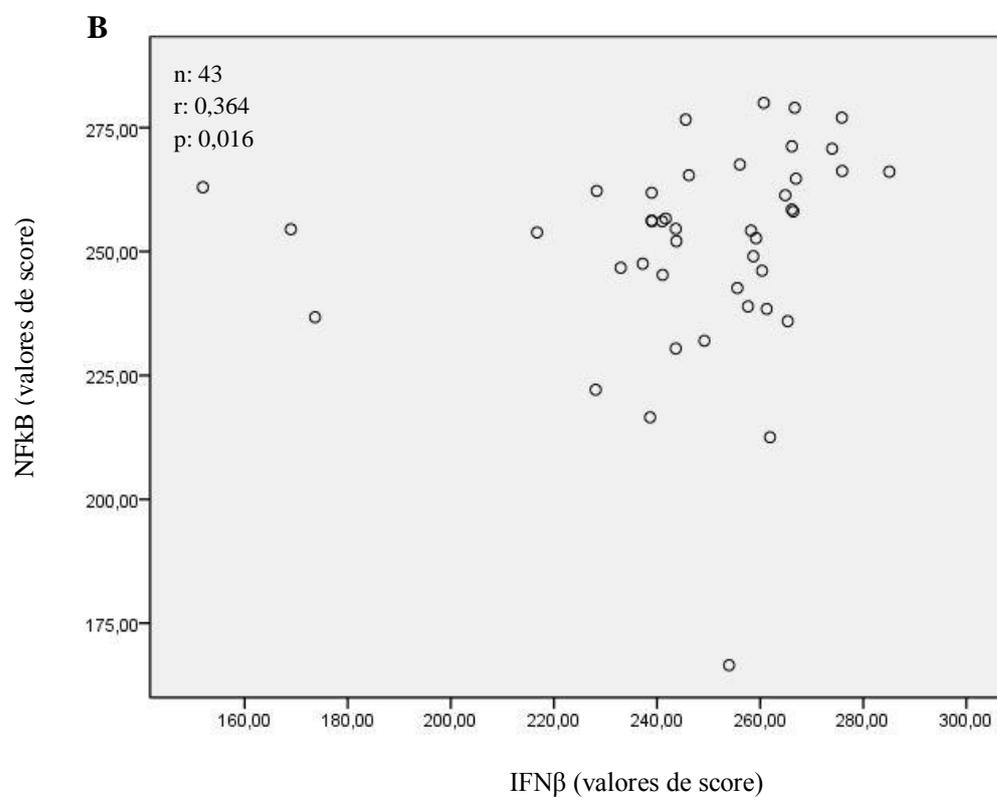
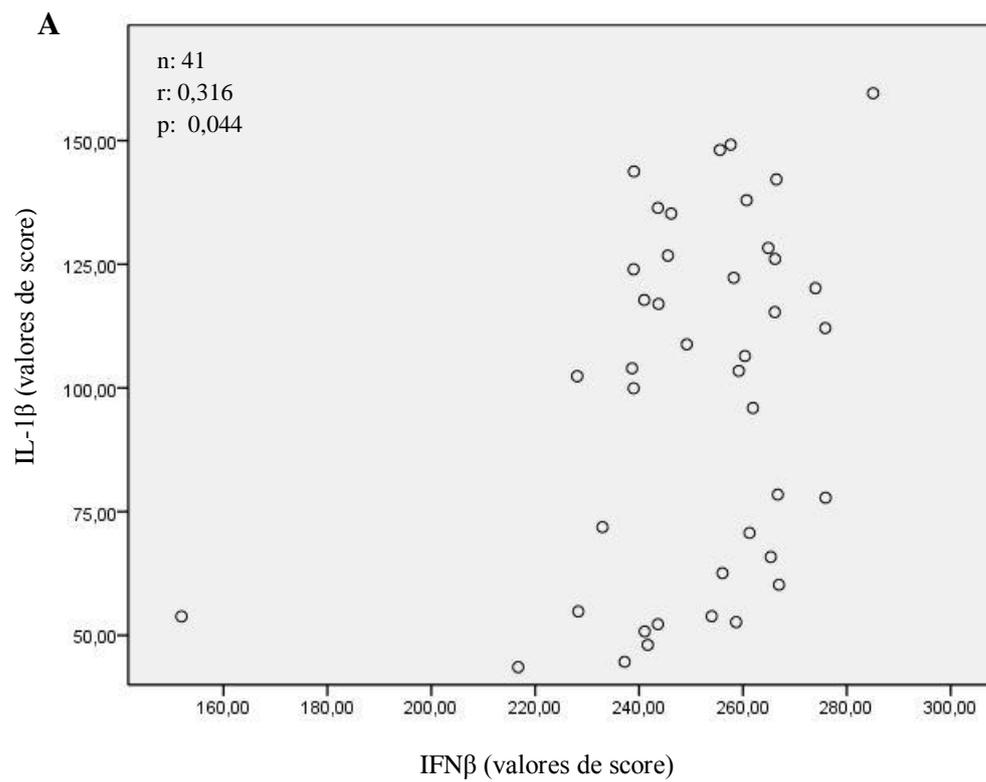
Tabla 8: Expresión de $IFN\beta$, $IL-1\beta$ y $NF\kappa B$ por las células epiteliales, los fibroblastos y las células mononucleares inflamatorias (C.M.I.).

	HBP			Cáncer Próstata		
	C. Tumoral	Fibroblasto	C.M.I.	C. Tumoral	Fibroblasto	C.M.I.
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
$IFN\beta$	44 (100)	44 (100)	43 (97,7)	102 (97,1)	103 (98,1)	101 (97,1)
$IL-1\beta$	41 (100)	41 (100)	39 (95,1)	106 (100)	101 (95,3)	101 (95,3)
$NF\kappa B$	43 (100)	43 (100)	43 (100)	106 (100)	101 (95,3)	101 (95,3)

4. Relación de la expresión simultánea de IFN β , IL-1 β y NF κ B

En un siguiente objetivo del estudio, hemos intentado relacionar la expresión de los diferentes factores (IFN β , IL-1 β , NF κ B), cuando se expresan de forma simultánea, tanto en el tejido hiperplásico como en el tumoral. Para ello hemos utilizado test no paramétricos, a través del coeficiente de correlación de Spearman.

En el tejido hiperplásico prostático analizado (Figura 4), nuestros resultados muestran una correlación directa entre la expresión del IFN β y la IL-1 β ($p= 0,044$). Del mismo modo, hemos obtenido una correlación directa entre los valores de score de la tinción del IFN β y del NF κ B ($p= 0,016$). Sin embargo, no hemos podido establecer una correlación significativa entre la expresión de la IL-1 β y del NF κ B ($p= 0,097$).



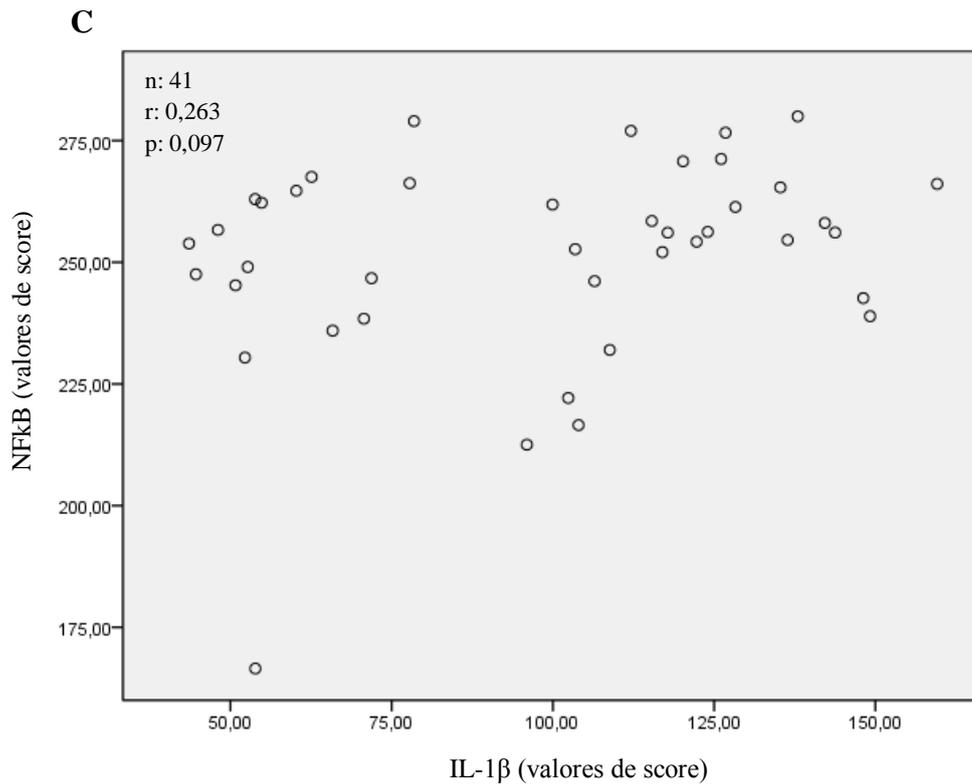
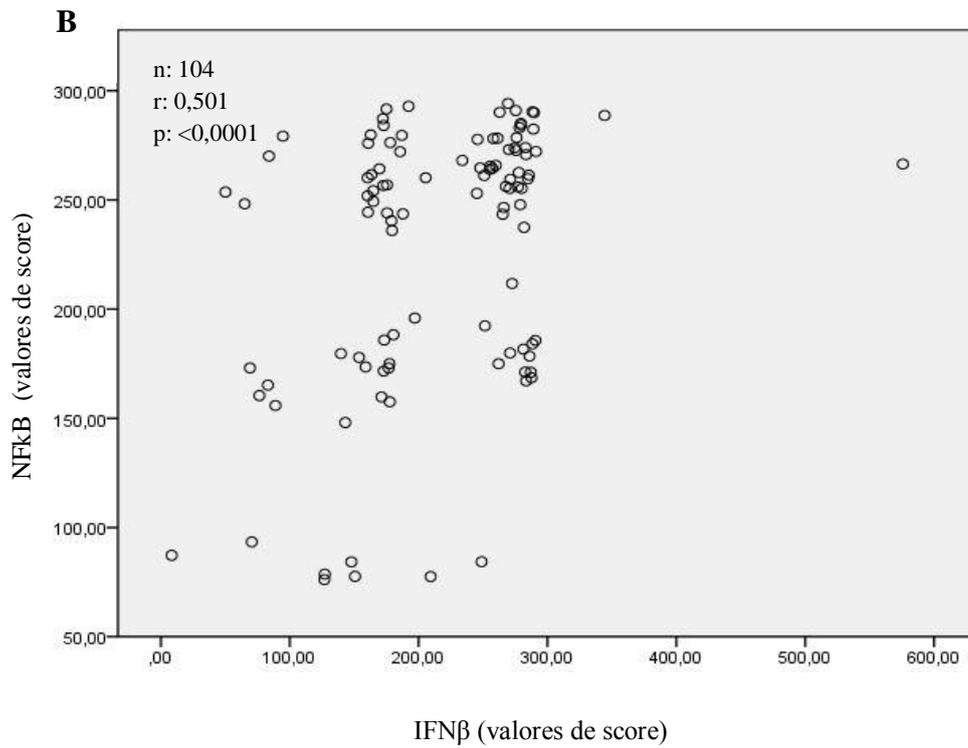
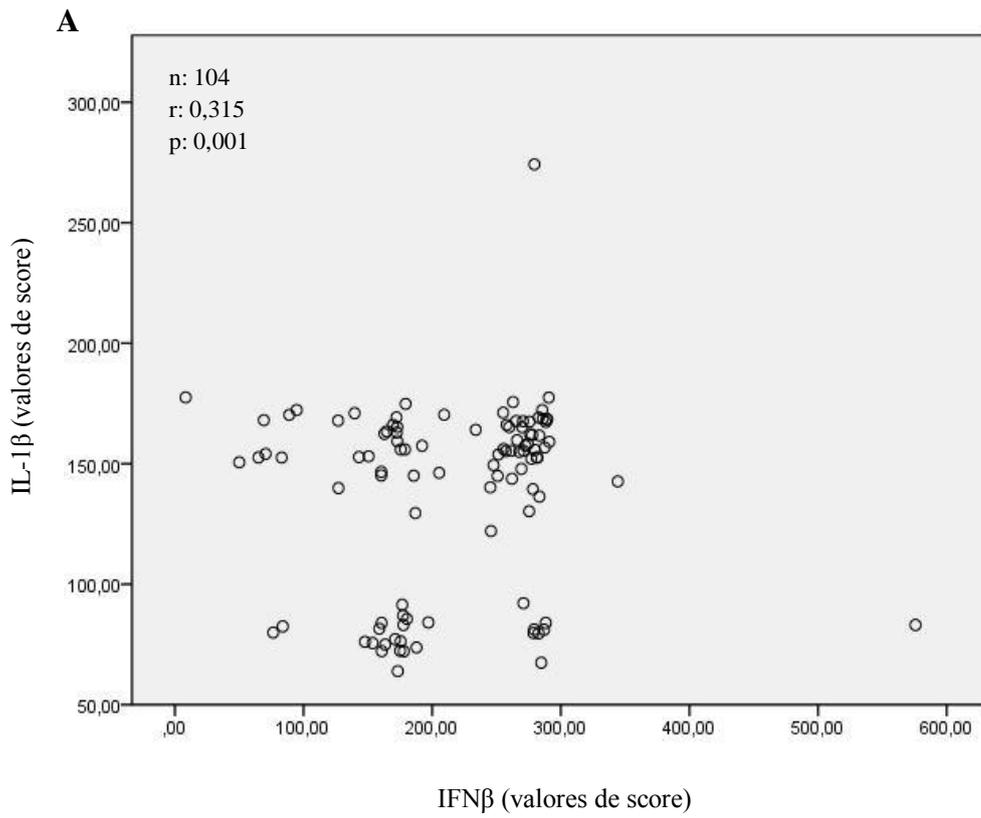


Figura 4: *A) Relación entre la expresión de IFNβ y la expresión de IL-1β en la HBP.*

B) Relación entre la expresión de IFNβ y la expresión de NFκB en la HBP.

C) Relación entre la expresión de IL-1β y la expresión de NFκB en la HBP.

Siguiendo el mismo procedimiento, hemos analizado la correlación de la expresión de los factores de forma simultánea en el tejido prostático tumoral (Figura 5); así, hemos obtenido una correlación directa entre la expresión del IFNβ y la IL-1β ($p= 0,001$); y del IFNβ con el NFκB ($p< 0,0001$). Sin embargo, no hemos encontrado una correlación significativa entre la expresión de la IL-1β y del NFκB ($p= 0,169$).



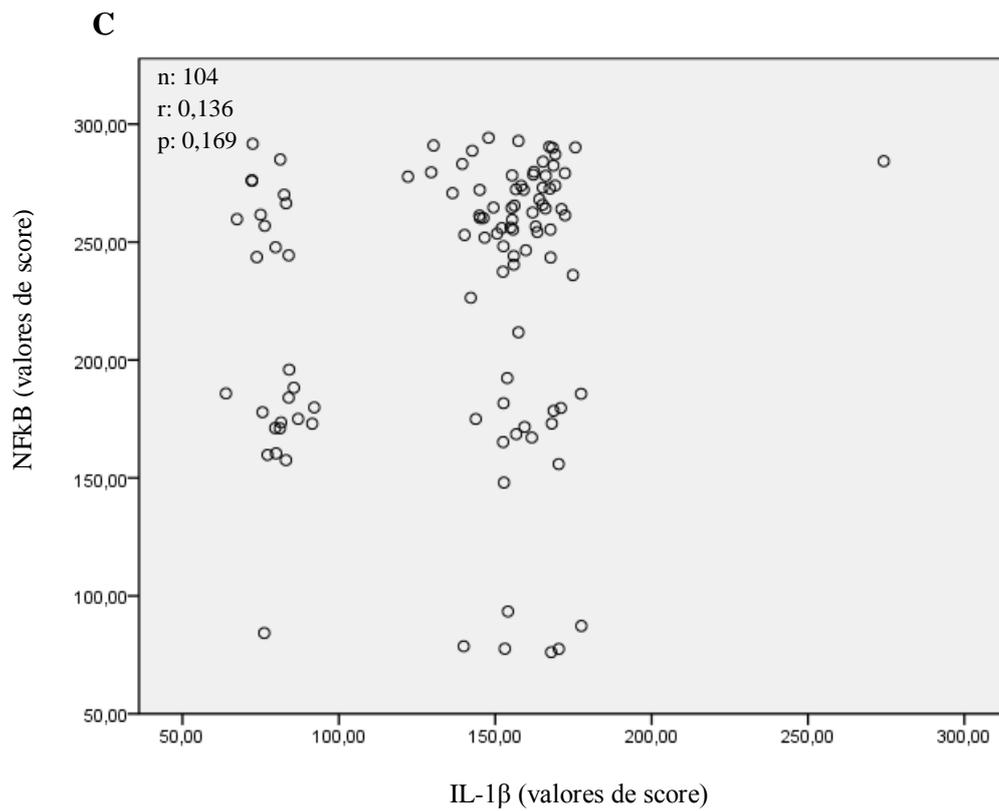


Figura 5: *A) Relación entre la expresión de IFNβ y la expresión de IL-1β en el CaP.*

B) Relación entre la expresión de IFNβ y la expresión de NFκB en el CaP.

C) Relación entre la expresión de IL-1β y la expresión de NFκB en el CaP.

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

Continuando con los objetivos iniciales planteados en nuestro estudio, hemos intentado establecer una correlación significativa entre la expresión de IFN β , IL-1 β y NF κ B, con las diferentes características clínico-patológicas de nuestros pacientes tanto en HBP como en CaP (Tabla 9).

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 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.

Tabla 9: Relación entre la expresión global (score) de los factores a estudio y las características clínico-patológicas de los pacientes con HBP o con CaP (valores de p).

	HBP			Cáncer próstata		
	IFN β	IL-1 β	NF κ B	IFN β	IL-1 β	NF κ B
Mediana	0,860	0,835	0,752	0,049	0,880	0,484
Edad						
Estadío Tumoral	—	—	—	0,247	0,550	0,559
Score de Gleason	—	—	—	0,157	0,072	0,369
PSA previo	0,111	0,135	0,900	0,468	0,920	0,697

En el tejido prostático hiperplásico analizado para nuestro estudio, los resultados muestran una correlación estadísticamente negativa, entre la expresión de IFN β e IL- β 1, y los niveles de PSA previo ($p= 0,009$ y $p=0,01$, respectivamente). Esto quiere decir que cuanto mayor sea la expresión de estas citoquinas en el tejido prostático hiperplásico, menor será el nivel de PSA previo (Figura 6).

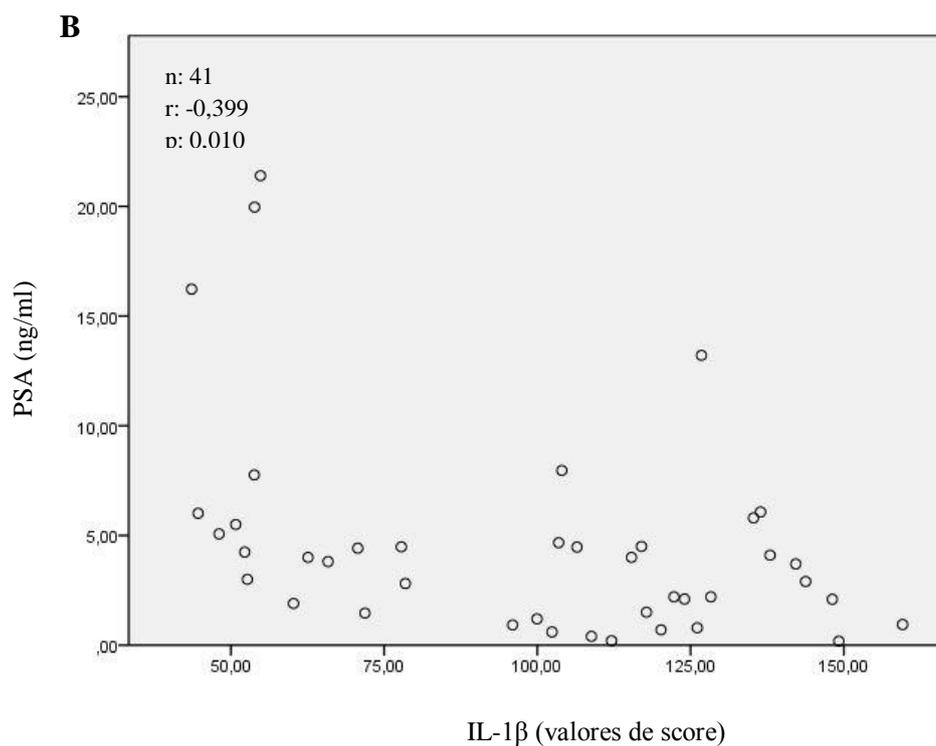
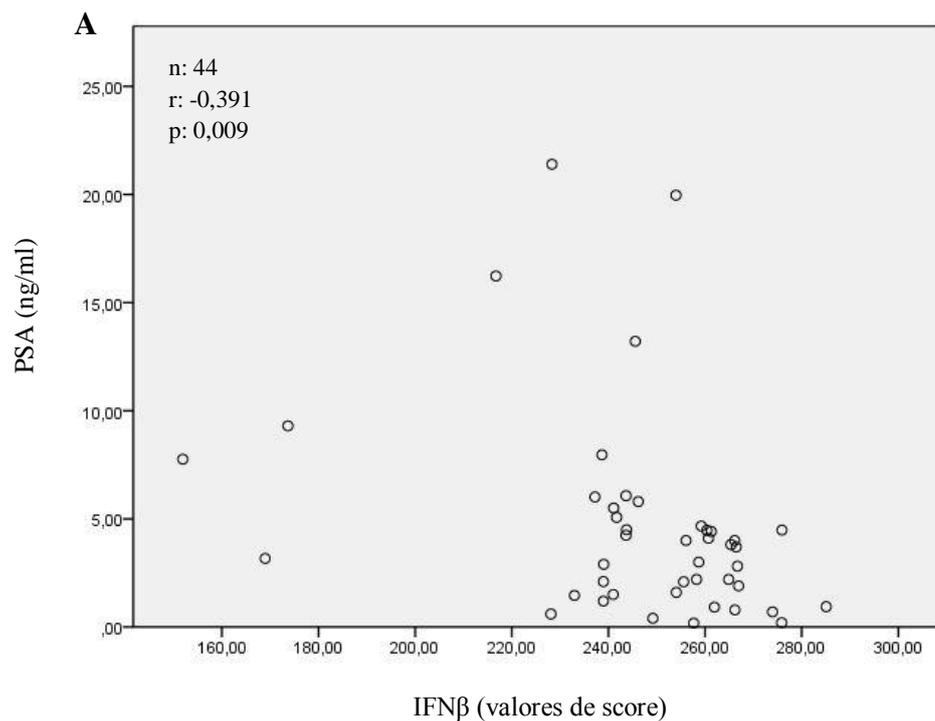


Figura 6: Correlación de los niveles de expresión del IFN β (A) y la IL-1 β (B) con los niveles de PSA previo en HBP.

En cuanto a los valores analizados en los carcinomas prostáticos, nuestros resultados muestran una correlación significativamente negativa entre la expresión de IFN β y el nivel de PSA ($p= 0,035$). Sin embargo, existe una correlación positiva entre la expresión de la IL-1 β y el PSA previo en pacientes con CaP (Figura 7). Esto quiere decir que cuanto mayor sea la expresión de IFN β , menor será el nivel de PSA previo; pero cuanto mayor sea la expresión de IL-1 β , también aumentará el nivel de PSA.

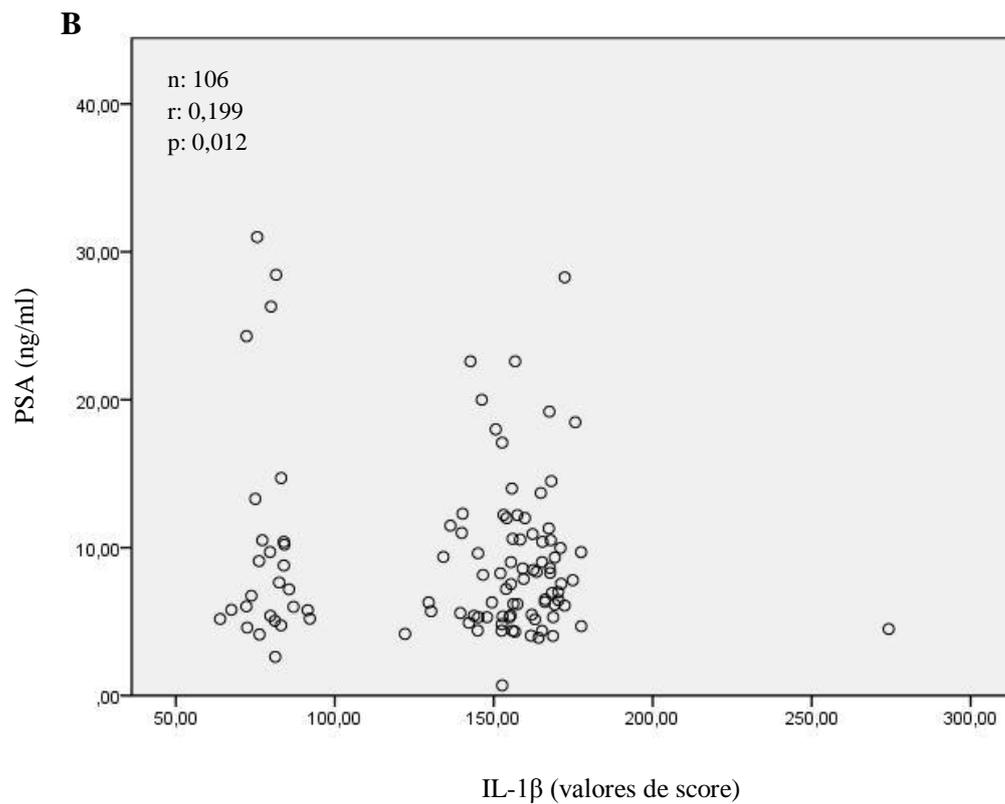
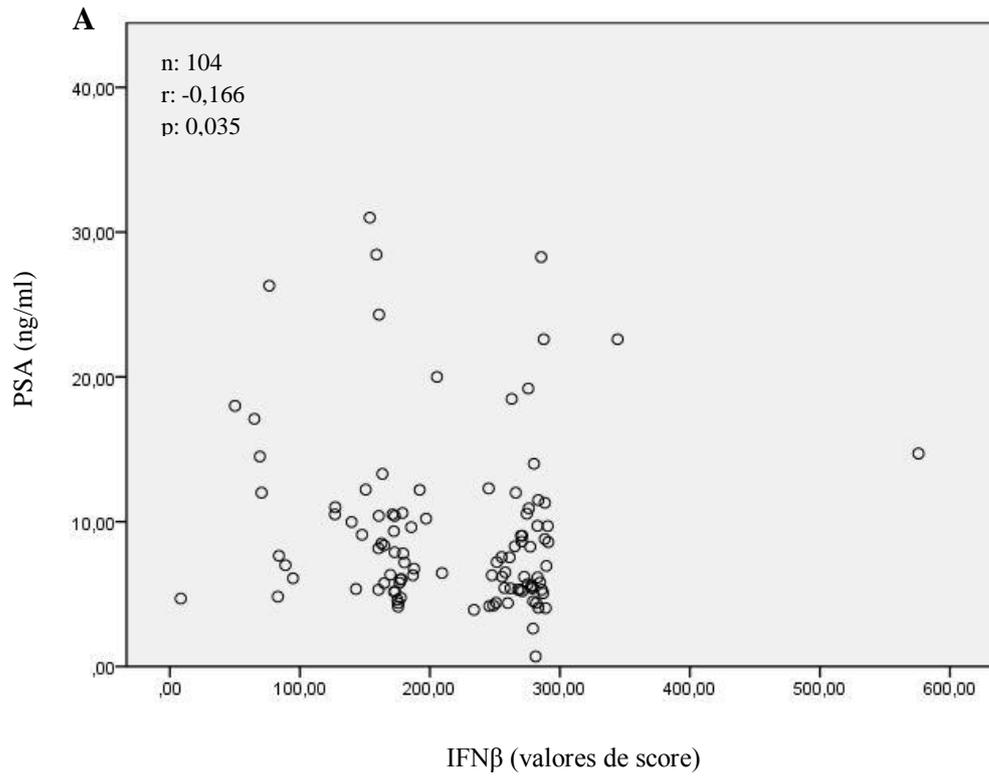


Figura 7: Correlación de los niveles de expresión del IFN β (A) y la IL-1 β (B) con los niveles de PSA previo en CaP.

Por otro lado, los valores de expresión del NFkB no muestran correlación alguna con los niveles del antígeno prostático, ni en el tejido hiperplásico analizado ni en el tumoral (Figura 8).

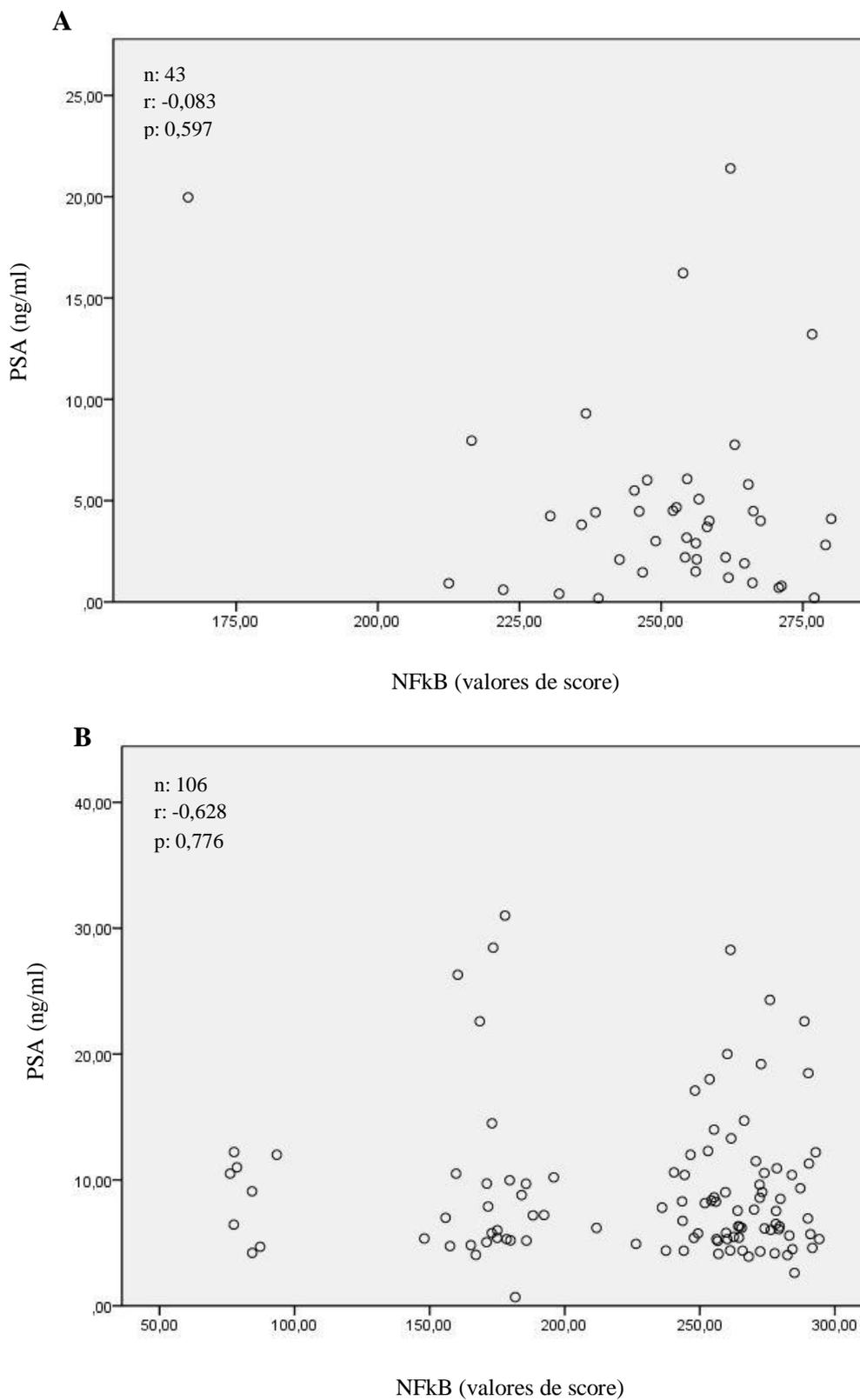


Figura 8: Correlación de los niveles de expresión del NFkB en la HBP (A) y en el CaP (B), con los niveles de PSA previo.

6. Relación de la expresión de los factores a estudio con la recurrencia bioquímica

No se ha encontrado relación entre la expresión de IFN β , IL-1 β , y NF κ B; con la recurrencia bioquímica en aquellos pacientes con CaP que se sometieron al tratamiento correspondiente.

Las figuras 9, 10 y 11, muestran la probabilidad de recurrencia bioquímica en los pacientes con CaP, dicotomizada en función del valor de la mediana de los scores correspondientes a los distintos factores relacionados con la inflamación.

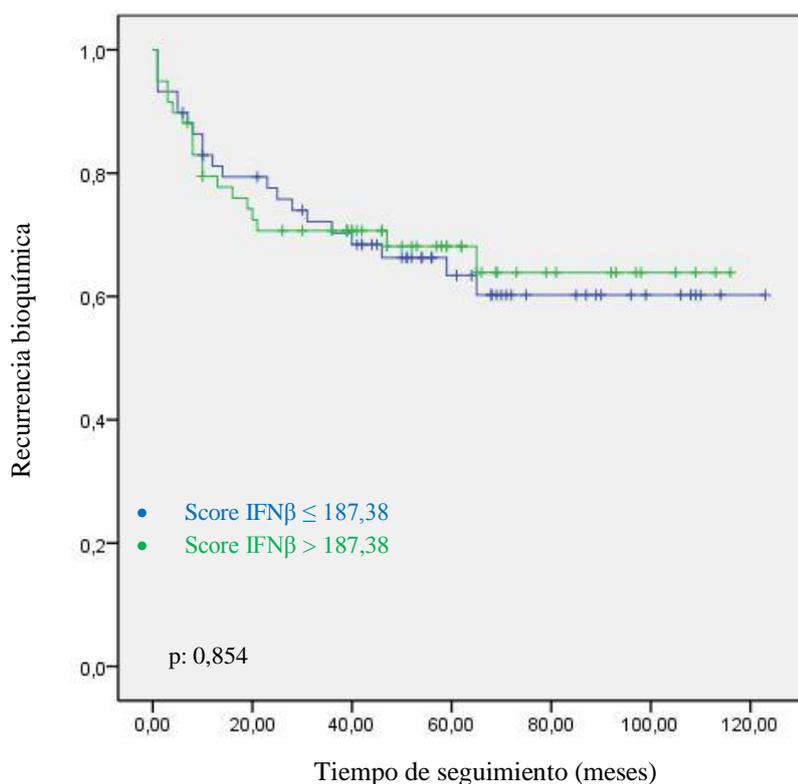


Figura 9: Curvas de probabilidad de recurrencia bioquímica en función de los valores de la mediana del score del IFN β .

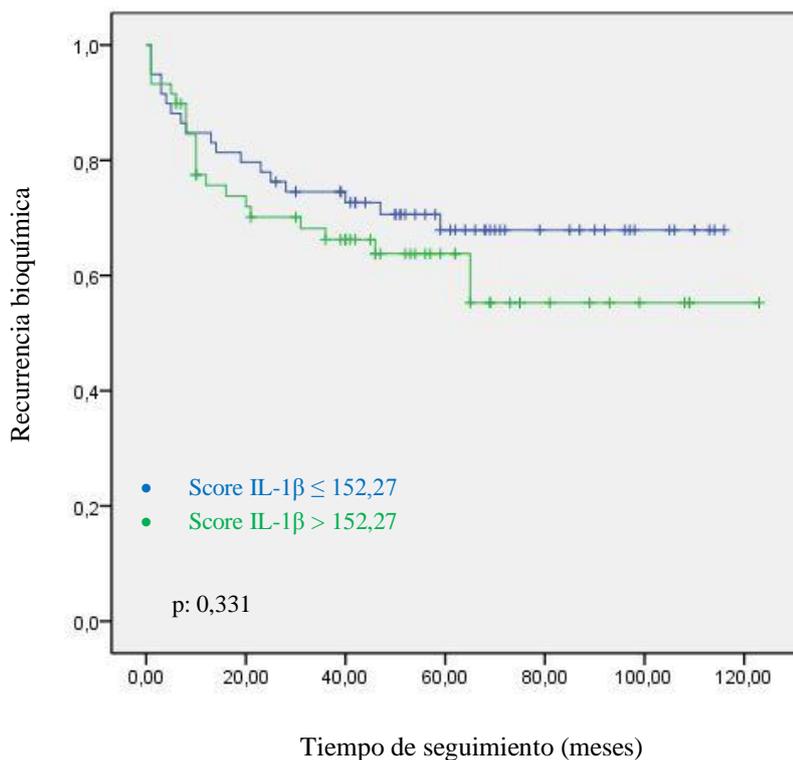


Figura 10: Curvas de probabilidad de recurrencia bioquímica en función de los valores de la mediana del score de la IL-1 β .

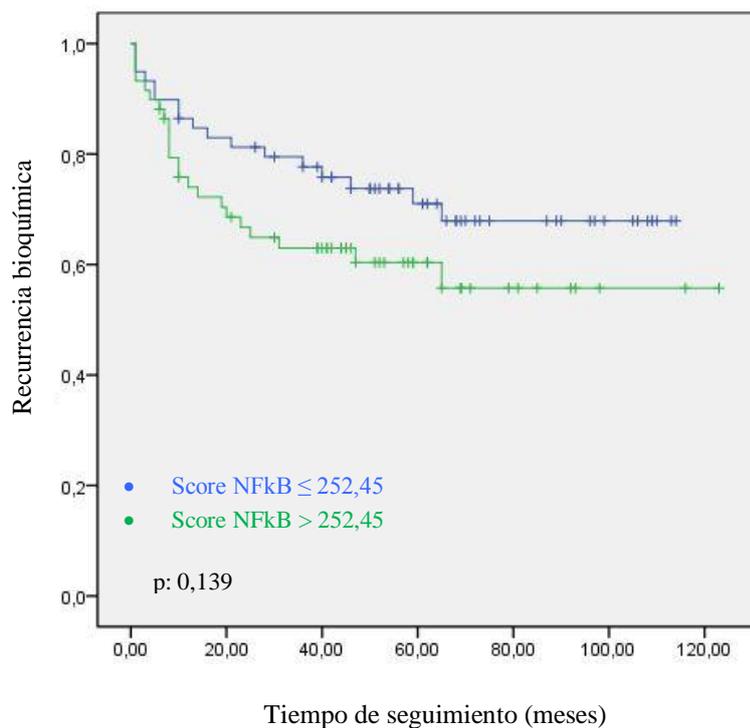


Figura 11: Curvas de probabilidad de recurrencia bioquímica en función de los valores de la mediana del score del NF κ B.

7. Relación de la expresión de los factores a estudio con la supervivencia de los pacientes

No se ha encontrado relación entre la expresión de IFN β , IL-1 β , y NF κ B; y la supervivencia de los pacientes con CaP.

Las figuras 12, 13 y 14 muestran las curvas de supervivencia de los pacientes con CaP, dicotomizadas de acuerdo al valor de la mediana de los scores correspondientes a los distintos factores estudiados.

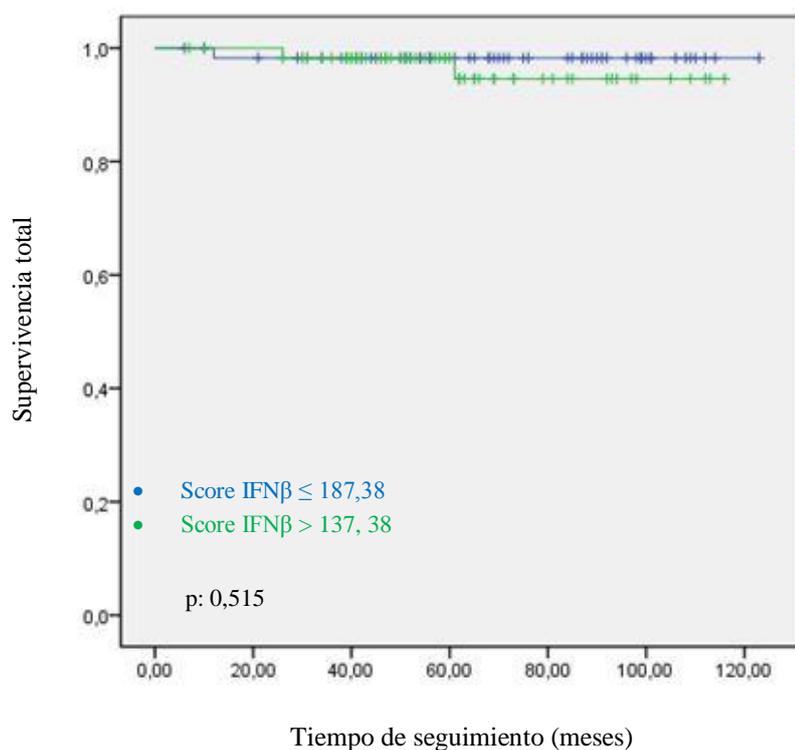


Figura 12: Curvas de supervivencia total en función de los valores de la mediana del score del IFN β .

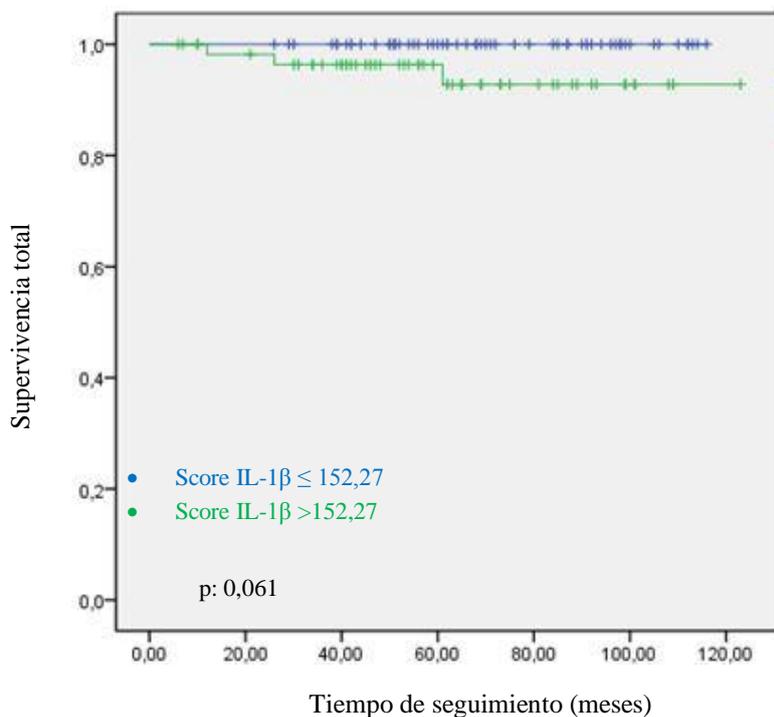


Figura 13: Curvas de supervivencia total en función de los valores de la mediana del score de la IL-1 β .

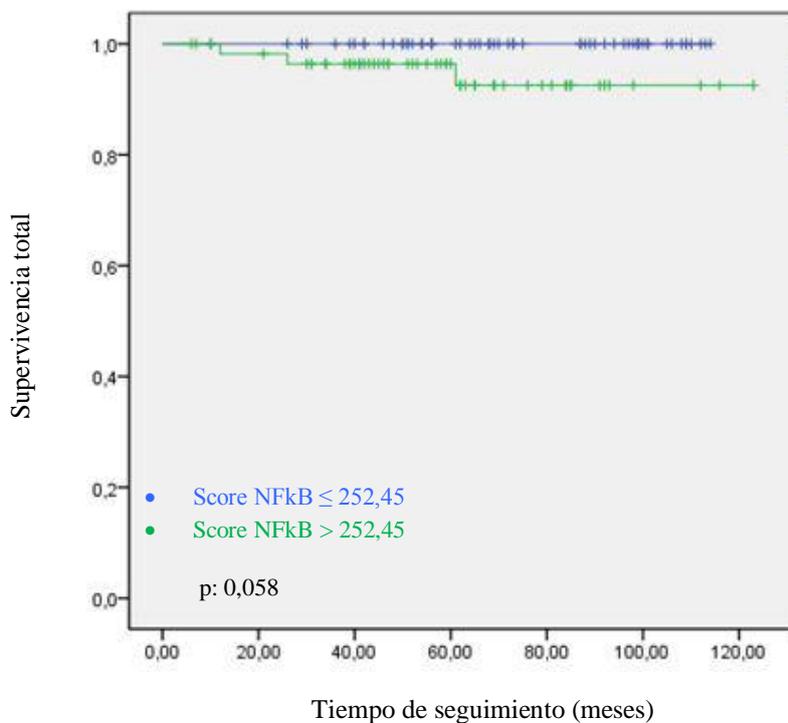


Figura 14: Curvas de supervivencia total en función de los valores de la mediana del score del NF κ B.

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 (59). 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 (60, 61).

Por otro lado, aunque el score de 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 (59). 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.

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 (44, 62).

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 tres factores relacionados con la inflamación, como son el IFN β , la IL-1 β y el NF κ B, 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 los tres factores en la HBP y en el CaP; mostrando una mayor expresión global en el tejido tumoral de la IL-1, mientras que el IFN β ha sido más expresado en hiperplasia. Asimismo, hemos comprobado que esta variabilidad se encuentra también presente en la expresión de los casos tumorales; llegando incluso a existir 12 casos en los que no se han expresado ninguno de los factores a estudio, hecho que no ocurre en el tejido hiperplásico, en el que siempre existe al menos, una mínima expresión de estos factores. Sin embargo, no hemos podido correlacionar este hecho con las características del paciente, del tumor o la recurrencia bioquímica o supervivencia.

Tanto en la HBP como en el CaP, todos los tipos celulares; es decir, células epiteliales, fibroblastos y células mononucleares inflamatorias, mostraron una expresión similar de los tres factores; por lo que podemos deducir que la diferencia de expresión reside en la cantidad expresada, sin tener en cuenta el tipo celular que los expresa. 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 (63, 64).

Por otra parte, nuestros resultados indican que la expresión del IFN β es mayor en la hiperplasia, actuando como un factor inflamatorio hipotéticamente dotado de cierta protección frente al desarrollo del proceso tumoral. Este hallazgo apoya el estudio llevado a cabo por Dong et al. (49), en el que demostraron que las células prostáticas cancerosas altamente metastásicas diseñadas para producir constitutivamente IFN β , 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.

Por el contrario, hemos comprobado que la expresión de la IL-1 β es mayor en el tejido tumoral que en el hiperplásico. Este resultado parece muy interesante teniendo en cuenta que en el estudio de Ricote y cols. (53) se relaciona la familia de la IL-1, concretamente la expresión de la IL-1 α 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.

A pesar de que una de las numerosas funciones llevadas a cabo por el NFkB, es la de la regulación de la IL-1 β y el IFN β (57); 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.

Otro objetivo de nuestro estudio era observar si existía alguna relación entre la expresión de alguno de los tres factores, y las características clínico-patológicas de los pacientes. En este sentido, hemos comprobado que existe una correlación inversa entre la expresión del IFN β y los niveles séricos preoperatorios de PSA, tanto en HBP como en CaP. Este dato nos confirma el hecho de que el IFN β actúa como factor protector frente a la malignización del proceso patológico. Ya que los niveles séricos de PSA son un indicador de malignidad y de peor pronóstico en el cáncer de próstata (65).

Siguiendo esta línea de investigación, podemos confirmar una correlación significativamente positiva entre la expresión de la IL-1 β y el nivel de PSA previo en CaP. Así, a una mayor expresión de esta citoquina, existe un mayor nivel de PSA, lo que nos confirma la predisposición de la IL-1 β para favorecer la carcinogénesis prostática. En este sentido, diferentes grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en la búsqueda de nuevos marcadores bioquímicos capaces de predecir el diagnóstico y el pronóstico del cáncer de próstata; estudiando la posible relación de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, TNF- α e IL-6), con la producción de PSA y la progresión del CaP (48, 66-68).

En resumen, este estudio muestra un patrón diferencial de expresión entre ciertos factores de la inflamación en la HBP y en el CaP. 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.

Conclusiones

1. La expresión global del IFN β es mayor en el tejido prostático hiperplásico, mientras que la expresión global de la IL-1 β es mayor en el tejido tumoral prostático.
2. Tanto en el CaP como en la HBP, los factores a estudio son expresadas por el estroma y por las células epiteliales, por lo que podemos concluir que la diferencia de expresión reside en la cantidad expresada, independientemente del tipo celular.
3. Existe una correlación directa entre la expresión simultánea del IFN β y la IL-1 β , tanto en tejido hiperplásico prostático como en el tumoral.
4. Una alta expresión del IFN β se relaciona con menores niveles séricos de PSA previos a la biopsia diagnóstica en ambos procesos prostáticos, mientras que una alta expresión de IL-1 β se relaciona con niveles elevados del marcador en el CaP.
5. En el presente estudio no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de IFN β , IL-1 β , y NF κ B y la recurrencia bioquímica o 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. 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.
3. 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):e12501.
4. McNeal JE. Normal histology of the prostate. Am J Surg Pathol. 1988 Aug;12(8):619-33.
5. Kramer G, Mitteregger D, Marberger M. Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease? Eur Urol. 2007 May;51(5):1202-16.
6. 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).
7. Lucia MS, Lambert JR. Growth factors in benign prostatic hyperplasia: basic science implications. Curr Urol Rep. 2008 Jul;9(4):272-8.
8. 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.
9. Konwar R, Chattopadhyay N, Bid HK. Genetic polymorphism and pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. BJU Int. 2008 Aug 5;102(5):536-44.
10. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. Lancet. 2003 Mar 8;361(9360):859-64.

11. 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.
12. Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. *Urology*. 2003 Dec 22;62(6 Suppl 1):3-12.
13. Nelen V. Epidemiology of prostate cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2007;175:1-8.
14. 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.
15. 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.
16. 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 3:30-6.
17. 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.
18. 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.
19. 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.

20. Martínez-Salamanca JI, Martínez Ballesteros C, Carballido Rodríguez J. [Epidemiological fundamentals of clinically localized prostate cancer]. *Arch Esp Urol*. 2011 Oct;64(8):703-10.
21. 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.
22. Bianco FJ, Jr., Wood DP, Jr., Grignon DJ, Sakr WA, Pontes JE, Powell IJ. 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.
23. 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.
24. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate*. 1990;17(4):337-47.
25. Gronberg H, Damber L, Damber JE. Familial prostate cancer in Sweden. A nationwide register cohort study. *Cancer*. 1996 Jan 1;77(1):138-43.
26. 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.
27. Bratt O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol*. 2002 Sep;168(3):906-13.
28. 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.
29. Fleshner N, Bagnell PS, Klotz L, Venkateswaran V. Dietary fat and prostate cancer. *J Urol*. 2004 Feb;171:S19-24.

30. Hsing AW. Hormones and prostate cancer: what's next? *Epidemiol Rev.* 2001;23(1):42-58.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.

38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep*. 1966 Mar;50(3):125-8.
43. Eiro N, Vizoso FJ. Inflammation and cancer. *World J Gastrointest Surg*. 2012 Mar 27;4(3):62-72.
44. Lorusso G, Ruegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol*. 2008 Dec;130(6):1091-103.
45. 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.
46. 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.

47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.

55. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996 Mar 15;87(6):2095-147.
56. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986 Aug 29;46(5):705-16.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev*. 2000 Oct 1;14(19):2410-34.
61. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jul 24;349(4):366-81.
62. Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2003 Sep 1;417(1):3-11.
63. 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.
64. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jan;4(1):71-8.

65. Saylor PJ, Kozak KR, Smith MR, Ancukiewicz MA, Efstathiou JA, Zietman AL, et al. Changes in biomarkers of inflammation and angiogenesis during androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Oncologist*. 2012;17(2):212-9.
66. Schalken JA. Molecular and cellular prostate biology: origin of prostate-specific antigen expression and implications for benign prostatic hyperplasia. *BJU Int*. 2004 Mar;93 Suppl 1:5-9.
67. Spiotto MT, Chung TD. STAT3 mediates IL-6-induced growth inhibition in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Prostate*. 2000 Feb 1;42(2):88-98.
68. Perry RA, Chamley JH, Robinson PM. Histochemically detected differences in cultured sympathetic neurons. *J Anat*. 1975 Jul;119(Pt 3):505-15.

