

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**CORRELACIÓN CLÍNICO PATOLÓGICA DE LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN
TNF/IL-1/NF-KB EN CÁNCER DE PRÓSTATA**

JOSÉ RAMÓN CANSINO ALCAIDE

2012

D. Jesús Vaquero Crespo, Director del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada **“CORRELACIÓN CLÍNICO PATOLÓGICA DE LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN TNF/IL-1/NF-KB EN CÁNCER DE PRÓSTATA”** presentada por José Ramón Cansino Alcaide, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizada dentro del Programa de Doctorado de Cirugía y cumple a mi juicio, con los requisitos necesarios para ser defendida ante un Tribunal.

Y para que conste, expido el presente certificado en Madrid, a 1 de Septiembre de dos mil doce

El Director,

Fdo.: Jesús Vaquero Crespo

Dña. MARÍA DEL MAR ROYUELA GARCÍA Profesora Titular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Universidad de Alcalá y D. FERMÍN R. DE BETHENCOURT CODES médico adjunto en Urología del Hospital Universitario La Paz, en virtud de Directores,

CERTIFICAN

Que Don José Ramón Cansino Alcaide, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo correspondiente a la Tesis Doctoral, que lleva por título **“CORRELACIÓN CLÍNICO PATOLÓGICA DE LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN TNF/IL-1/NF-KB EN CÁNCER DE PRÓSTATA”**, cumpliéndose todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa y aprobación.

LOS DIRECTORES DE TESIS

Fdo. Dña. María del Mar Royuela García

Fdo. D. Fermín R de Bethencourt

D. DAMIÁN GARCÍA OLMO, Jefe de Sección de Cirugía Coloproctológica del Hospital Universitario La Paz y Catedrático de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid, en virtud de Tutor

CERTIFICA

Que Don José Ramón Cansino Alcaide, ha realizado bajo mi supervisión como Tutor la Tesis Doctoral, que lleva por título **“CORRELACIÓN CLÍNICO PATOLÓGICA DE LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN TNF/IL-1/NF-KB EN CÁNCER DE PRÓSTATA”**, cumpliéndose todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa y aprobación.

EL TUTOR DE TESIS DOCTORAL

Fdo. D. Damián García Olmo

Desde siempre he visto fomentar el esfuerzo y el trabajo en casa gracias a la labor de mis padres, intentando que alcanzáramos tanto mi hermana como yo todas nuestras metas y potenciar la sana competitividad en aras de mejorar cada vez más, aunque eso supusiera un esfuerzo para ellos.

Es en casa, de mano de mi padre, donde aprendí a valorar y a respetar la medicina y de cómo el ejercicio de ésta profesión puede ayudar a tantas personas, comprobando en incontables ocasiones y con enorme satisfacción, el agradecimiento espontáneo de los pacientes hacia él.

Una de esas metas con la que mi padre siempre me ilusionaba era la Tesis.

Un día, siendo Residente de 5º año, Fermín me sorprendió con un reto: “Hace años hice un trabajo del que se puede elaborar una posible Tesis, ¿quieres?” A lo que yo respondí por supuesto que sí aunque no tenía ni idea de a lo que me estaba enfrentando.

Poco a poco fuimos recogiendo datos y empezando lo que con el tiempo iba tomando forma y siendo cada vez más consistente.

Poco después conocí a Mar Royuela, mejor dicho, a MAR, ya que es una persona con mayúsculas, la verdadera artífice de ésta Tesis y la que junto a todo el equipo del Departamento de Biología Celular de Alcalá, destacando a Gonzalo y Beatriz (la experta en estadística) ya que sin su ayuda hubiera sido un trabajo del todo incompleto, ha hecho posible que a lo largo de todo éste tiempo no tirara nunca la toalla, que siguiera luchando con una materia desconocida para mí hasta entonces y que sacara tiempo de donde no tenía para poco a poco ir construyendo éste trabajo que ahora madura.

Es una persona que nunca se cansa de trabajar y de ayudar, siempre colaborando, siempre enseñando y siempre con una sonrisa, transmitiendo serenidad y seguridad a pesar de todas las dificultades con las que nos hemos encontrado por el camino.

Todos ellos y sobretodo mi directora Mar, me han enseñado mucho en cuanto a cómo trabajar en equipo optimizando recursos y utilización de todo el material de laboratorio tan necesario en un trabajo de éste tipo.

Gracias a los Servicios de Urología y Anatomía Patológica de Alcalá, en especial a los Drs. Sánchez-Chapado y Martínez-Onsurbe por su aportación de material necesario para el estudio de las muestras con las que se ha estado trabajando tanto y nunca suficientemente agradecido.

Pero en todo momento me encontré con una ayuda extra, una energía vital para mí y que es el motor de mi vida, aquello que me hace sentir más fuerte y que me da alas para sobreponerme a todas las dificultades, Paloma y Ramón.

Ellos han pagado mucho de éste trabajo ya que el tiempo que le quitas a tu familia es el tiempo que más te duele.

Siempre apoyándome, animándome y sin quejarse nunca del poco tiempo que paso con ellos, han sido para mí un pilar fundamental en el cual me he impulsado para trabajar con fuerza y para que pudieran estar orgullosos de su marido y de su padre.

A todos vosotros, muchas gracias ya que sin vuestra ayuda ésta que también es vuestra Tesis nunca podría haberse realizado.

A mis padres y hermana

A Paloma, Ramón ... y quien Dios quiera

Esta Tesis Doctoral se ha podido realizar gracias a la financiación concedida por el Plan Nacional de I+D+i del Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2007-61928).

I. INTRODUCCIÓN	1
1.- Cáncer de próstata	3
1.1. Epidemiología.....	3
1.1.1. Incidencia en el cáncer de próstata.....	4
1.1.2. Etiología del cáncer de próstata	8
1.2. Historia natural del Cáncer de Próstata.....	15
1.3. Histopatología.....	17
1.3.1. Histología de la próstata.....	17
1.3.2. Otras patologías de la próstata	19
1.4. Clasificación Histopatológica del Cáncer de Próstata.	21
1.4.1. Desarrollo y Evolución del cáncer	21
1.4.2. Gradación histológica	21
1.5. Tratamiento del cáncer de próstata.	23
1.5.1. Tratamiento del cáncer de próstata clínicamente localizado.....	23
1.5.2. Diagnóstico y Tratamiento del cáncer de próstata recurrente	24
1.5.3. Factores Pronósticos del cáncer de próstata.....	27
2.- Homeostasis Tisular	30
3.- Citoquinas en el Cáncer de Próstata	32
3.1. Características generales de las citoquinas	32
3.2. Receptores de citoquinas	34
3.3. Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α).....	34
3.3.1. Mecanismos de acción de TNF- α	37
3.4. Interleuquina 1 (IL-1).	39
3.4.1. Receptores de IL-1	40
3.5. Señal de transducción anti-apoptótica/ super-vivencia (NF-Kb).....	42
4.- Hipotesis de Trabajo y Objetivos.....	44
II. MATERIAL Y MÉTODOS	47
1-. Materiales.....	49
1.1. Muestras	49
1.2. Anticuerpos primarios utilizados.....	50
1.3. Anticuerpos secundarios utilizados	51

2.- Métodos	51
2.1. Western blot.....	51
2.1.1. Procesamiento de la muestra para western blot	51
2.1.2. Electroforesis.....	52
2.1.3. Transferencia proteica.....	53
2.1.4. Inmunomarcaje.....	54
2.2. Procesamiento de muestras para microscopía óptica	58
2.2.1. Fijación de muestras	58
2.2.2. Inclusión en parafina	59
2.2.3. Tinción hematoxilina-eosina	59
2.2.4. Procesamiento para inmunohistoquímica.....	61
2.3. Densitometría óptica.....	64
2.3.1. Inmunohistoquímica.....	64
2.3.2. Western blot	64
2.3.3. Evaluación y puntuación del inmunomarcaje	65
2.3.4. Tratamiento estadístico	65
III. RESULTADOS	67
1.- Activación de TRAF-2	69
1.1. Western blot.....	69
1.2. Inmunohistoquímica	71
TNF- α	71
TNFRI.....	72
TRAF-2.....	72
2.- IL-1 y sus receptores	74
2.1. Western blot.....	74
2.2. Inmunohistoquímica	77
IL-1 α	77
IL-1 β	77
IL-1Ra.....	78
IL-1RI.....	79
IL-1RII.....	79

3.- Activación de NIK.....	81
3.1. Western blot.....	81
3.2. Inmunohistoquímica	83
IRAK	83
TRAF-6.....	83
4.- Ruta de transducción de NIK/NF-kB.....	85
4.1. Western blot.....	85
4.2. Inmunohistoquímica	87
RIP	87
NIK.....	87
5.- Activación de NF-kB	89
5.1. Western blot.....	89
5.2. Inmunohistoquímica	91
p-Ikk	91
Ikk.....	91
p-IkB.....	92
IkB	93
6.- NF-kB	95
6.1. Western blot.....	95
6.2. Inmunohistoquímica	97
NF-kB (p50)	97
NF-kB (p65)	97
7.- Correlación clínica de los componentes de la ruta de transducción estudiada .	99
7.1. Análisis de frecuencia de los parámetros clínicos	99
7.2. Análisis de frecuencia de los factores de la ruta de transducción estudiada	100
7.3. Correlación entre marcadores en estudio y marcadores clásicos	102
7.4. Curvas de supervivencia para los parámetros clínicos	104
7.5. Curvas de supervivencia para los factores estudiados.....	105
7.6. Análisis de cox unifactorial para los parámetros clínicos	108
7.7. Análisis de cox unifactorial para los factores estudiados	109
7.8. Análisis de cox multifactorial.....	110

IV. DISCUSIÓN	111
TNF- α y su receptor (TNFRI)	114
TRAF-2.....	116
Familia IL-1 y sus receptores	117
IRAK	120
TRAF-6.....	121
RIP	121
NIK	122
Ikk/p-Ikk/IkB/p-IkB	122
Factor nuclear kappa B (NF-kB)	124
Correlación entre los parámetros inmunohistoquímicos estudiados y los marcadores clásicos.	126
Evaluación de la capacidad pronóstica de los componentes de la ruta de transducción estudiada	129
V. CONCLUSIÓN	131
VI. BIBLIOGRAFÍA	135

1. INTRODUCCIÓN

1- CÁNCER DE PRÓSTATA

1.1. EPIDEMIOLOGÍA

El carcinoma prostático es la cuarta neoplasia más frecuente del hombre en el mundo y posiblemente la enfermedad oncológica más prevalente (Parkin y cols., 1993).

La Internacional Agency for Research on Cancer (IARC) que forma parte de la OMS y se considera la principal fuente de información mundial para conocer la incidencia y prevalencia de éstas enfermedades, en datos de 2008, describe una incidencia en el mundo de 85.7 casos por cada 100000 habitantes con una mortalidad de 9.9 por cada 100000 habitantes. En 2002 la incidencia era de 25.3 casos por cada 100000 habitantes y la mortalidad era de 8.2 casos por cada 100000 habitantes (<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=905>).

Su incidencia es mayor en regiones occidentales desarrolladas, pudiendo existir factores ambientales relacionados con la etiología de la enfermedad. En Estados Unidos es la segunda neoplasia con mayor mortalidad, después del cáncer de pulmón (Landis y cols., 1999). En 2005 se diagnosticaron 232900 nuevos casos y murieron por ésta enfermedad 30350 varones (Jemal y cols., 2005).

La incidencia de éste tipo de neoplasia, es superior en la población afro-americana, siendo la prevalencia del carcinoma prostático en hombres caucásicos mayores de 65 años de 1180 nuevos casos de cada 100000 habitantes, mientras que en la población afro-americana con la misma edad es de 1698 nuevos casos de cada 100000 habitantes en éste país. Más del 75% de los tumores se diagnostican en personas mayores de 65 años. En menores de 65 años, la incidencia de carcinoma prostático para los blancos americanos es de 45 de cada 100000 habitantes, y en los afro-americanos es de 81 nuevos casos de cada 100000 (Landis y cols., 1999).

En Europa, el cáncer de próstata es el tumor sólido más común con 214 nuevos casos por cada 1000 hombres (Jemal y cols., 2008). Así, alrededor del 15% de los cánceres masculinos son cáncer de próstata en los países desarrollados en comparación con el 4% de los cánceres de los hombres en los países en desarrollo. Hay grandes diferencias regionales en las tasas de incidencia del cáncer de próstata con un rango de 68.8 en Malta a 182 en Bélgica (Ferlay y cols., 2010; Heidenreich y cols., 2011).

En España es la tercera localización más frecuente (Granado de la Orden y col., 2006). Se estima que en el año 2000 la incidencia se acercó a 120 nuevos casos de cada

100000 habitantes y en la Comunidad de Madrid de 100.4 por cada 100000 habitantes (Herranz-Amo, 2000).

Desde un punto de vista cronológico, teniendo como país de referencia a Estados Unidos, la incidencia del cáncer de próstata, del periodo comprendido entre 1973-1986 aumentó en un 178%. El aumento se acentuó especialmente entre 1986-1991, cuando se impuso la biopsia transrectal a la resección transuretral y se multiplicó por 10 el uso diagnóstico del PSA para justificar la biopsia de próstata y diagnosticar un mayor número de casos de cáncer de próstata (Potosky y cols. 1995).

La repercusión clínica de esa mayor incidencia debido a un aumento en el diagnóstico del cáncer de próstata, está también influenciada por la disminución de la mortalidad observada respecto de la esperada.

La probabilidad de que un hombre desarrolle un cáncer de próstata en su vida es de 15.4%. El aumento de la incidencia se ha relacionado con el uso de procedimientos diagnósticos para detectar enfermedad precoz (Scardino y cols., 1992).

1.1.1. Incidencia en el cáncer de próstata

A) La Edad

Es el factor de riesgo más importante para desarrollar cáncer de próstata. Desde el nacimiento hasta los 39 años tiene una probabilidad entre 10000; de los 40 a los 59, de 1 entre 103; de los 60 a 79 años, de 1 entre 8.

Entre los 30 y los 40 años, los hombres tienen pequeños focos neoplásicos evolucionando en personas mayores hacia lesiones más extensas con características de progresión tumoral.

Se estima que un 33.3% de los hombres en la 8ª década de la vida (Sánchez Chapado y cols, 2003) y hasta un 70% de los varones con más de 80 años tiene cambios histológicos compatibles con cáncer de próstata (Pienta y Esper, 1993).

A pesar de lo anterior, se considera que un 10% de los tumores prostáticos no progresan clínicamente, resultando poco probable que produzca manifestaciones clínicas a lo largo de la vida del paciente.

Se considera tumor insignificante a aquel con un volumen tumoral inferior a 0.5 cc y se acepta como un tumor sin significación clínica (Stamey y cols., 1993; Huland y cols., 2002; Allan y cols., 2003; Rabets y cols., 2004). Otros autores consideran tumor

insignificante a aquel con un volumen tumoral inferior a 0.2 cc y tumor mínimo a aquel con un volumen tumoral entre 0.2 y 0.5 cc (Epstein y cols., 1994)

B. Factores étnicos:

En un mismo ámbito geográfico, el cáncer de próstata afecta con incidencia diversa a grupos étnicos. Teniendo como parámetro la edad, se identifican más lesiones PIN y tumores más avanzados en las próstatas de varones afroamericanos que en los ciudadanos norteamericanos de origen europeo o residentes en África (Natarajan y cols., 1989; Sakr y cols., 1993; Pientla y cols., 1995). Así, las tasas de mortalidad son generalmente altas en poblaciones predominantemente, de raza negra (el Caribe, 26.3 por 100.000 y en el África subsahariana, ASR 18 a 19 por 100.000), muy baja en Asia (en el sudeste de Asia Central 4.1 por 100.000 por ejemplo) e intermedios en Europa y Oceanía. (Globocan, 2008: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/prostate.asp>).

Se ha podido relacionar el aumento de la incidencia del cáncer de próstata precoz en 3 niveles: Un primer nivel lo constituiría la edad de inicio más precoz, en afroamericanos en relación con altos niveles de testosterona sérica; un segundo nivel, lo constituirían los de origen caucásico, mientras que en los de raza asiática el riesgo es inferior pudiendo estar en relación con ésta menor incidencia descrita. Se ha demostrado una actividad reducida de 5 α -reductasa (Ross y cols., 1992; Pientla y cols., 1995).

Las diferencias en supervivencia se han cuantificado en 66% a los cinco años en pacientes afroamericanos y un 81% en norteamericanos de origen europeo (Wingo, 1995). Estas diferencias eran especialmente acusadas en pacientes con menos de 70 años (Pientla y cols., 1995).

En pacientes afroamericanos el pronóstico en supervivencia libre de recidiva después de prostatectomía radical para estadios localizados es inferior a otros grupos étnicos, con un “*risk ratio*” de 1.6 (Klotz, 2007).

El diagnóstico en estadios avanzados se ha intentado relacionar con factores culturales, económicos y raciales. Aunque en pacientes afroamericanos la presencia de estadios avanzados al diagnóstico inicial era significativamente más frecuente que en el resto de los grupos étnicos (49.5% frente a 35.9%, $p < 0.05$), asociándose asimismo a un nivel educativo inferior, el aparente efecto de relación desaparecía al ajustar el análisis en grupos con niveles educativos, de edad y residencia, sugiriendo una desviación en el momento del diagnóstico (Bennett y cols., 1998).

C) Incidencia geográfica:

Tomando como punto de partida el periodo comprendido entre 1988-1991, la incidencia clínica del cáncer de próstata en países como Suiza, Suecia y Noruega, es de 20 ó superior por 100000 hombres, mientras que en el continente americano es de 16.8 por 100000 hombres y en el continente asiático es de 2.6 en Hong Kong, 3.8 en Japón y de 4.2 en Singapur por cada 100000 hombres (Ferly y cols., 2004).

En los países desarrollados la incidencia y mortalidad por cáncer de próstata en 2008 era de 61,7 nuevos casos por cada 100000 habitantes y 10,5 la mortalidad, mientras que en los países poco desarrollados, la incidencia es de 12 nuevos casos por cada 100000 habitantes y 5,6 la mortalidad (Globocan, 2008: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=902>).

En concreto en la Europa del norte, la incidencia y mortalidad son respectivamente de 100.4 y 35.9 (tasa anual por cada 100000 varones). Sin embargo, en los países menos desarrollados, la incidencia y mortalidad es de 6.5 y 3.6. En Asia oriental la incidencia es de 3.9 y la mortalidad es de 1.9 por cada 100000 varones al año (Ferly y cols., 2004).

Esto sugiere que a pesar de que la prevalencia de cáncer de próstata es similar en países con sistemas sanitarios desarrollados, su incidencia clínica varía (Ballentine y cols 1990).

D) Dieta:

En Estados Unidos se ha realizado una evaluación con distintos tipos de dieta, tamaño corporal y actividad física, entre pacientes de distinto origen racial, frente a individuos con edad, origen étnico y lugar de residencia similar. Se ha establecido una asociación estadísticamente significativa entre el riesgo de cáncer de próstata y la ingesta total de grasas en cualquier tipo étnico. Al ajustar éste dato a las grasas saturadas el riesgo se moderó y desapareció en otros componentes de la dieta y calorías.

Se ha sugerido que un factor con participación en la incidencia de este tumor es la ingesta de grasas saturadas, pudiendo aumentar entre 2 y 3 veces el riesgo, sin depender éste de la masa corporal, factores de actividad física o ingesta de micronutrientes (Giovannucci y cols, 1993)

Otros nutrientes que pueden tener relación con el cáncer de próstata son los ácidos grasos esenciales (como omega-3); licopenos (tomates y sus derivados con alto poder antioxidante); zanahoria y carotenoides; vitaminas E, D, A y retinoides (los productos

derivados de la vitamina A ejercen una acción in vitro suprimiendo la acción de la 5 α -reductasa y por tanto de la dihidrotestosterona); selenio.

Los fitoestrógenos presentan actividad estrogénica, inhibición de la enzima 5 α -reductasa y de la aromatasas, inhibición de la proteinkinasa tiroxina-específica y la inhibición de las topoisomerasas del ADN (arroz, soja, cereales, Té verde) (Romero y cols., 2003).

E) Predictores hormonales:

En un metaanálisis que evaluó de forma restrictiva estudios que contenían información sobre valores hormonales séricos, edad e índice de masa corporal, se ha descrito que varones con valores de testosterona o IGF-1 en el límite superior de la distribución normal de la población estudiada tienen un riesgo dos veces superior a desarrollar cáncer de próstata. Sin embargo, los valores de dihidrotestosterona y estradiol no se relacionaban con incidencia aumentada (Shaneyfelt y cols., 2000).

F) Predisposición Genética:

En estudios epidemiológicos se observó que el riesgo de padecer cáncer de próstata se duplicaba si existía el antecedente en un familiar directo, mientras que se multiplicaba por cuatro si existían dos o más familiares directos afectados (Brandt y cols., 2010). En concreto, la incidencia de cáncer de próstata fue del 40.4% frente a 29% ($p < 0.001$) si existía o no el antecedente oncológico, respectivamente (Aprikian y cols., 1995). Esta diferencia era similar en los distintos grupos étnicos (Whittemore y cols., 1995). Tanto en afroamericanos como en norteamericanos de origen europeo el riesgo es superior si existe el antecedente de cáncer de próstata en el padre y se duplica si es en un hermano (Hayes y cols., 1995). En los tumores diagnosticados precozmente hasta el 40% tienen componente hereditario (Carter y cols., 1992, 1993). El criterio de predisposición genética se define como el diagnóstico de cáncer de próstata, en tres generaciones, más de tres individuos afectados familiares directos entre sí, o dos varones de la misma generación diagnosticados antes de los 55 años de edad. Se estima que en Estados Unidos la predisposición genética representa el 9% del cáncer de próstata total diagnosticado (Carter y cols., 1992). Se ha sugerido que la presencia del alelo que predispone a cáncer de próstata implica hasta un 90% de posibilidad de desarrollo de la enfermedad a los 85 años.

Respecto al papel del screening de cáncer de próstata en éstos pacientes con riesgo familiar, podemos decir que ha demostrado conseguir sobrediagnóstico y sobretratamiento (Barry y Muller, 2009; Welch y Albertsen, 2005) y que no existen diferencias entre el pronóstico de cáncer de próstata familiar y esporádico. El riesgo incrementado de muerte en hombres con historia familiar de cáncer de próstata, es consecuencia de la mayor incidencia en ésta población (Roehl y cols. 2006; Roemeling y cols., 2006).

Otros trabajos recientes detectan un leve descenso de la mortalidad en los pacientes con historia familiar que los esporádicos, quizás influido por realizar screening en éstos pacientes o realizarlo antes que a otros pacientes (Brandt y cols., 2010) ya que el screening puede reducir levemente la mortalidad (Andriole y cols., 2009; Schroder y cols., 2009).

1.1.2. Etiología del cáncer de próstata

ALTERACIONES GENÉTICAS Y MOLECULARES EN EL CANCER DE PRÓSTATA. CARCINOGENESIS

El fenómeno de carcinogénesis es consecuencia de la acción de diferentes factores (tóxicos, hormonales, genéticos, infecciosos y otros) sobre la célula que acaban confiriéndole una ventaja adaptativa. El dilema estriba en decidir cuál es la causa de esta inestabilidad somática acumulada durante los 30 ó 40 años que se precisan para desarrollar los cambios fenotípicos. Parece que un paso inicial consiste en la inactivación del gen de la transferasa S del glutatión o GSTP1 por medio de una hipermetilación que lo transforma en un gen “silente”, enzima que se encuentra implicada en la detoxificación de factores ambientales que pudieran actuar de promotores (Gonzalvo y cols., 2004; Nelson y cols., 2009).

Se revisa a continuación las alteraciones cromosómicas en el desarrollo fenotípico del carcinoma de próstata desde lesiones precursoras (PIN), invasivas, metastásicas y en situación de refractariedad al tratamiento hormonal.

A) Alteraciones cromosómicas

Las anomalías genómicas detectadas en diferentes tumores prostáticos son muy variables, si bien predominan las pérdidas de material genético sobre las ganancias (Cheng y cols., 1998). Las deleciones o inactivación de genes localizados en los cromosomas 8p, 16q y con menor frecuencia sobre los cromosomas 10, 17p y 18q (Isaacs y Carter, 1993)

se encuentran en los primeros pasos de la célula en el proceso de adquisición del fenotipo maligno.

El defecto más común en los PIN consiste en pérdidas en el cromosoma 8p. Se pueden detectar alteraciones en los loci 8p11-12 y 8p22 en el 20% de los PIN, y hasta en el 70% de los carcinomas (De Marzo y cols., 1999).

En el cáncer incipiente de próstata se han identificado numerosos cambios genéricos en los cromosomas 17p, 10q y 16q (Isaacs y Carter, 1993). El significado funcional de estos cambios es desconocido. El cromosoma 17 parece ser especialmente importante en el proceso de la carcinogénesis prostática, ya que en él se sitúa el gen GSTP1 mencionado previamente y, además, codifica el gen de p53. La detección de alguno de los cambios genéticos precoces en muestras de próstata podría tener valor como técnica de diagnóstico precoz (Isaacs y cols., 1994).

En la enfermedad metastásica, la delección del área distal del cromosoma 10 (10q23) se identifica con más frecuencia en muestras de metástasis que en piezas de cáncer prostático localizado (Brothman y cols., 1990), lo que sugiere que el área codificada por este cromosoma contiene genes represores del crecimiento a distancia sin impedir el crecimiento local. La existencia de genes supresores con actividad como la descrita tiene ya confirmación experimental y parece abarcar también genes localizados en el cromosoma 11 (Ichikawa y cols., 1992), en concreto la introducción en modelos tumorales en ratas de este cromosoma limitó el desarrollo de metástasis.

La activación o represión de determinados genes puede ocurrir como consecuencia de la alteración de segmentos reguladores específicos. La delección del brazo largo del cromosoma 16 (16q22, 1) se identifica en el 30% de los cánceres localizados y en el 70% de las células procedentes de metástasis de cáncer de próstata (Umbas y cols., 1992). Esta región contiene el gen para la E-cadherina, glicoproteína de superficie que se encuentra en las células epiteliales y funciona como una molécula de adhesión dependiente del calcio. Una menor expresión de esta molécula se asocia a una mayor capacidad invasiva.

B) Crecimiento no dependiente de andrógenos:

Inicialmente la mayoría de los cánceres de próstata responden a maniobras que reducen el ambiente androgénico. La adquisición de la capacidad para crecer en un ambiente deficitario en andrógenos parece estar relacionado con la amplificación del brazo largo del cromosoma 8, donde se expresa el oncogén myc, ganancias en el Xp11-q13,

donde se codifica el receptor androgénico, y aumento de la expresión de genes localizados en 7p, donde se localiza el receptor para el factor de crecimiento epidérmico, y 5q, donde reside el gen supresor APC. Estos cambios no sólo permitirían el crecimiento en este nuevo ambiente hostil, sino que serían además indispensables para la progresión de la enfermedad. Más adelante se menciona el papel del receptor androgénico. En cuanto a los factores de crecimiento polipeptídico, entre los que se encuentran factores de crecimiento similares a la insulina y las familias de factores de crecimiento epidérmico y fibroblástico, son fundamentales para el crecimiento de las células del cáncer de próstata. Aunque algunos de estos factores podrían ser los responsables de la progresión en situación de privación androgénica, la manera final en la que actúan aún no es conocida (Steiner, 1993).

C) Dependencia hormonal del cáncer de próstata

En el varón la testosterona es el andrógeno circulante más importante, 95% de la cual es producida por las células de Leydig testiculares bajo el estímulo de la gonadotropina hipofisaria (LH). La testosterona es el andrógeno responsable del crecimiento de la glándula prostática. Sin embargo, se comporta como una prohormona, ya que la forma activa en la próstata es su metabolito reducido por la enzima 5 α -reductasa, la dihidrotestosterona, metabolismo que tiene lugar directamente en la glándula prostática,

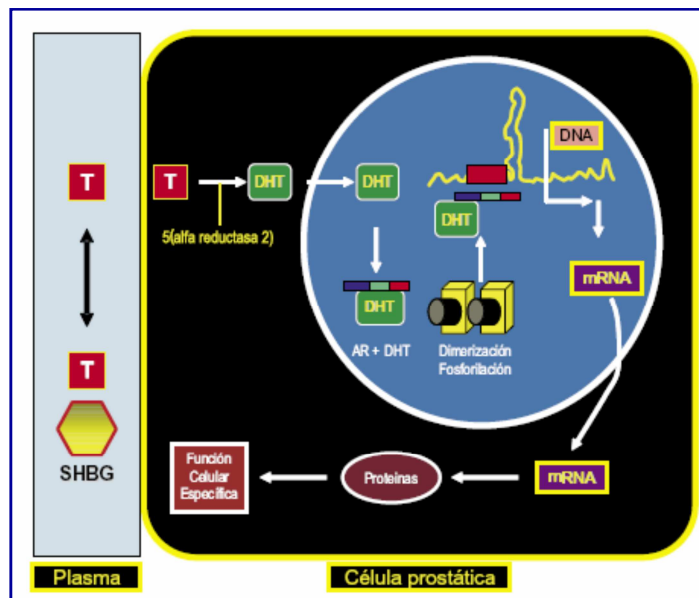


Figura 1. Conversión de testosterona en DHT y su acción en la célula (T: Testosterona; SHBG: Globulina transportadora; DHT: Dihidrotestosterona). Tomado de Uribe, 2005.

donde constituye la forma en mayor concentración (Uribe, 2005).

La acción de los andrógenos se realiza a través de receptores de esteroides de alta afinidad. El complejo hormona-receptor se une a secuencias de reconocimiento nucleares reguladoras de la transcripción del DNA, lo que induce la transcripción de genes por un mecanismo no completamente dilucidado, pero que podría abarcar cambios conformacionales en la cromatina y acetilación de las histonas, proteínas que forman parte del núcleo celular (Calvo y Pérez-Manga, 2002)

En los primeros estadios de desarrollo, los andrógenos se unen a receptores de andrógenos (RA) localizados exclusivamente en células mesenquimáticas. Por tanto, la diferenciación de la próstata y su posterior crecimiento depende inicialmente del estroma prostático. Posteriormente las células epiteliales adquieren el RA y presentan un crecimiento autónomo con respecto a las células estromales. La regulación endocrina de la próstata es la consecuencia de la acción de un mediador exógeno, la testosterona, que desencadena la expresión de factores de crecimiento que se encuentran, a su vez, modulados en forma autocrina o paracrina por otros factores inhibidores del crecimiento o inductores de la apoptosis. El efecto sobre el ciclo celular ocurre a través de proteínas reguladoras como quinasas (CDK1, CDK2, CDK4), ciclinas (D3 y A) y otras con acción inhibidora (p21, p27 y p16). Además, aumenta la expresión de factores estimulantes del crecimiento vascular, asegurando la nutrición adecuada de la próstata en desarrollo (VEGF o factor de crecimiento del endotelio vascular). Al mismo tiempo, dentro de este complejo entramado de factores estimulantes e inhibidores el complejo andrógeno-RA activa genes que limitan el crecimiento prostático como bcl-2, que tiene una correlación inversa con la expresión del RA en el tejido prostático y cuya inactivación induce apoptosis celular (Calvo y Pérez Manga, 2002).

D) Endocrinología del carcinoma de próstata

El comportamiento clínico del carcinoma de próstata refleja su dependencia de los andrógenos circulantes, de forma que no existe si no ha habido exposición a andrógenos y, una vez desarrollado, la deprivación androgénica (por medio de la castración quirúrgica o medicamentosa) induce respuestas clínicas en el 70-80% de los pacientes (Denis, 1991).

Durante el desarrollo inicial la glándula suprarrenal aporta el ambiente androgénico necesario para el crecimiento y diferenciación de la próstata hasta que el testículo inicia la producción de testosterona, si bien su aportación es posteriormente insuficiente. La

castración quirúrgica sólo reduce en un 60% la dihidrotestosterona en la glándula prostática, por lo que para evitar la aparición de clones sensibles a dosis reducidas de dihidrotestosterona algunos autores defienden la utilización de bloqueo androgénico completo (BAC) como tratamiento supresor de elección. Aún con BAC, invariablemente el tumor progresará en uno o dos años como resultado de la selección de clones de crecimiento no dependiente de andrógenos. Las células adquieren la habilidad de evitar la vía de crecimiento activada por el RA, posiblemente por medio de la inducción de otros factores de crecimiento o por la producción autocrina de sus propios factores de crecimiento como IGF-I y II, EGF, TGF- α , DGF, FGF y otros que se sobreexpresan en muestras de adenocarcinomas prostáticos cuando se comparan con la glándula prostática normal (Steiner, 1993)

La presencia de testosterona en el torrente sanguíneo es un prerrequisito para el desarrollo de la hipertrofia prostática benigna y del carcinoma de próstata, como corroboran observaciones clínicas y de laboratorio. Dosis altas de testosterona inducen en modelos animales cáncer de próstata (Pollard y cols. 1982). Los inhibidores de la 5 α reductasa han demostrado poder de quimioprevención en el cáncer de próstata e incluso podría retrasar la progresión a la fase de significación clínica en pacientes sometidos a actitud de vigilancia activa tras el diagnóstico de su cáncer de próstata. Por ello, la FDA (Federal Drug Administration) ha etiquetado a éstos inhibidores de la 5 α reductasa como quimioprolifáticos para el cáncer de próstata (Finelli y cols., 2011).

La castración o el hipopituitarismo antes de la pubertad elimina el riesgo de cáncer de próstata y un ambiente hiperestrogénico o la castración después de la pubertad lo reduce considerablemente. Por tanto, aunque un ambiente androgénico es imprescindible para la carcinogénesis prostática, no queda clara la razón por la que se desarrolla la enfermedad en unos varones y no en otros. Las determinaciones de andrógenos en pacientes con carcinoma de próstata no son significativamente más altas que en la población normal, ni siquiera cuando se examinan comparativamente poblaciones con una menor incidencia de este tumor, como ocurre en la población japonesa en relación a la occidental (Winder y cols., 1971). Por otra parte, si se ajusta por otros factores que influyen en los niveles de testosterona, como son la edad, consumo de alcohol, hábito tabáquico, sí se evidencia hasta un 15% superior en varones de raza negra, aunque no se objetivan diferencias significativas con respecto a la población japonesa, que, en cambio,

presenta niveles inferiores, hasta en un 25-50%, de androstanediol y androsterona, ambos marcadores de la actividad de la enzima 5 α -reductasa (Ross y cols., 1986).

Los resultados controvertidos en cuanto a un ambiente hiperandrogénico en la población de riesgo elevado de cáncer prostático no excluye la posibilidad de un hiperambiente androgénico limitado a la próstata que condicione el desarrollo del tumor. Algunos estudios demostraron diferencias en niveles de andrógenos cuando se analiza el fluido seminal en pacientes con y sin carcinoma prostático (Zumoff y cols., 1982; Wynder y cols., 1984; Petrow, 1986).

E) El receptor androgénico (RA) y su papel en la carcinogénesis

El RA forma parte de la familia de proteínas de transcripción, en la que se incluyen otros receptores de hormonas esteroideas (Evans, 1988), que se encuentran codificados en el brazo largo del cromosoma X. El RA está compuesto de cuatro dominios diferentes. De ellos, el dominio aminoterminal presenta una cola de tripletes de nucleótidos que codifican el aminoácido glutamina y que varía entre individuos de 8 a 39 residuos de longitud. Una menor longitud se asocia con una mayor actividad del RA y además se correlaciona con un mayor riesgo de presentar cáncer de próstata, con una mayor agresividad de los tumores (Jenster y cols., 1994; Giovanucci y cols., 1997) y su aparición en edades precoces (Hardy y cols., 1996). La correlación entre fragmentos poli-CAG más cortos y el desarrollo de cáncer de próstata podría explicar la mayor incidencia de esta neoplasia en la comunidad negra americana, que presentan fragmentos generalmente más cortos de CAG que otras razas (Edwards y cols., 1992).

Además de la variabilidad descrita en la cola de nucleótidos del gen RA, se describieron también mutaciones, más frecuentes en estadios avanzados, que se identifican hasta en el 50% de los pacientes (Suzuki y cols., 1993; Taplin y cols., 1995; Evans y cols., 1996) La mayoría de estas mutaciones consisten en la sustitución de aminoácidos, que pueden ser “silentes”, aparentemente sin afectar la función del RA *in vitro*, alterar la especificidad del RA por el ligando o inactivar el RA. El primer grupo de mutaciones no parecen conferir ninguna ventaja a las células tumorales, mientras que el segundo y tercer grupo podrían ser cambios inherentes al crecimiento en situación de baja impregnación androgénica o independencia de andrógenos. Por tanto, el RA podría participar en los mecanismos que gobiernan la transición del cáncer de próstata hormonodependiente a hormonoindependiente. El RA está amplificado en el 28-30% de los tumores de pacientes

en tratamiento con antiandrógenos (Visakorpi y cols., 1995; Koivisto y cols., 1997). Pequeños cambios, como sustituciones de aminoácidos en el centro activo o de ligadura del receptor, modifican la afinidad y especificidad del receptor. Como consecuencia, el tumor puede crecer en la presencia de antiandrógenos, andrógenos adrenales y otros esteroides como estrógenos y progesterona (Elo y cols., 1995; Hakimi y cols., 1996; Bentel y cols., 1997). Finalmente, a medida que el tumor progresa no precisa de andrógenos ni del RA por mecanismos aún no comprendidos.

Visakorpi y cols. (1995) comunicaron la existencia de un gen de amplificación AR en los tumores hormonorretractarios, lo que sugiere, que el aumento del número de copias de RA, influiría en la progresión de los tumores andrógeno-independientes. (Koivisto y cols., 1997). Se han informado también mutaciones en RA en tumores andrógeno-independientes que vuelven al RA susceptible a ligandos no androgénicos y pueden contribuir a la progresión del cáncer de próstata (Fentom y cols., 1997).

Varias investigaciones han indicado que citoquinas como la interleuquina-6, que intervienen en la iniciación y progresión del cáncer de próstata podrían interferir con el RA. Culig y cols. (1994) demostraron interferencias entre el Oncogen her-2/neu y el RA pudiendo existir un mecanismo mediante el cual los receptores de la tirosin quinasa desempeñarían un papel importante en la progresión del cáncer de próstata.

F) Hipótesis de la carcinogénesis en el cáncer de próstata

Todos los hallazgos que se han descrito deben encuadrarse en una hipótesis plausible que explique el proceso que termina en el cáncer de próstata. Por lo dicho anteriormente, es muy improbable que no haya una dependencia del ambiente androgénico en el desarrollo inicial del tumor, ya que los andrógenos son indispensables para la carcinogénesis. Esta evidencia tiene una gran implicación terapéutica, ya que una maniobra de supresión androgénica no sólo destruiría las células tumorales, sino que actuaría sobre los mecanismos patogénicos de la misma enfermedad. El siguiente eslabón parece situarse en anomalías de funcionamiento del RA que inducirían un desarrollo acelerado de la enfermedad. A medida que el tumor crece se hace menos dependiente de los andrógenos, quizá por medio de un RA exquisitamente sensible a los pocos andrógenos circulantes o bien menos específicos, por lo que es capaz de activarse por otras hormonas esteroideas, y como resultado de una mayor preponderancia de diversos factores y receptores de factores de crecimiento en el control celular, que ya son capaces de

perpetuar la multiplicación de manera absolutamente independiente del medio ambiente androgénico.

1.2. HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Una vez que el CP ha sido diagnosticado su progresión es particularmente lenta. En los casos de enfermedad metastásica la supresión hormonal consigue controlar el proceso durante 2 a 4 años hasta que vuelve a progresar, momento desde el cual la muerte sobreviene en 1 a 2 años (Flanigan y cols., 1996). Sin embargo, en casos de enfermedad localizada, la progresión de la enfermedad es mucho más lenta. En muchos casos es heterogénea, lo que sugiere la existencia de distintas subcategorías celulares dentro de la enfermedad que justifican un comportamiento distinto, cada una con su propia velocidad de progresión y agresividad.

A pesar de todo ello todavía existen muchas sombras en el conocimiento de la historia natural de esta enfermedad. A este respecto los mejores estudios sobre el comportamiento del CP han sido los realizados sobre la base de líneas de tratamiento conservador-observacional y de los estudios de piezas quirúrgicas y de autopsia.

El tratamiento conservador-expectante consiste en la abstención terapéutica y estrecha vigilancia de los pacientes, reservando el tratamiento hormonal para los casos que durante el seguimiento desarrollen síntomas locales o a distancia. Muchos autores han sugerido esta modalidad de tratamiento para pacientes con esperanzas de vida inferiores a 10 años, mientras que en el caso de que se trate de pacientes con una esperanza de vida estimada superior a los 10 años esta línea de tratamiento es controvertida (Klotz 2007).

El “watchfull waiting” o tratamiento diferido como también se le conoce al tratamiento guiado por los síntomas, se instauró en la era pre-PSA refiriéndose a un manejo conservador del cáncer hasta el desarrollo de progresión local o a distancia momento en el cual el paciente será tratado de forma paliativa con RTU-P desobstructiva y terapia hormonal o radioterapia para las lesiones metastásicas.

Vigilancia Activa o monitorización activa describe una actitud de no tratar al paciente de forma inmediata y realizar un seguimiento estrecho para tratar cuando aparezcan criterios claramente predefinidos de progresión como un corto periodo de duplicación de PSA (Guías Europeas de Cáncer de Próstata 2010)

Por otra parte, diferentes autores definen una serie de criterios que van desde menos de dos cilindros afectados en la biopsia de próstata, a menos del 20% del cilindro

afectado por el tumor, independientemente de la esperanza de vida estimada para el paciente, haciendo por tanto más hincapié en la vigilancia activa de casos seleccionados de tumores de bajo volumen y bajo grado (Albertsen, 2010; Epstein, 1994; Soloway, 2010)

Lo que se desprende de los distintos estudios realizados a este respecto es la importancia del grado histológico de la enfermedad para predecir el comportamiento de la misma y la supervivencia. Según Albertsen y cols. (1995), de 451 pacientes diagnosticados de CP y tratados de forma conservadora, la supervivencia a este tumor a los 15 años se sitúa en torno al 91%, 76% y 54% en los casos bien diferenciados, moderadamente y pobremente diferenciados, respectivamente. Estos resultados apoyan los obtenidos por Chodak y cols. (1994) quienes demostraron la presencia en el CP de una dependencia directamente proporcional del estadio y del grado histológico para la progresión tumoral y mortalidad.

Por otro lado, también el volumen tumoral ha demostrado tener influencia en el comportamiento del CP. Las principales observaciones fueron hechas por Stamey y McNeal sobre piezas de prostatectomía, cistoprostatectomía y estudios de autopsia (McNeal y cols., 1986; McNeal y cols., 1990; Stamey y cols., 1993). Estos autores pusieron de manifiesto la relación entre el volumen tumoral, el grado histológico y la agresividad tumoral. Demostraron que al aumentar el volumen tumoral, aumenta la probabilidad de que se trate de un tumor indiferenciado y de que exista enfermedad extraprostática. Así, el volumen tumoral encontrado en las piezas de prostatectomía es mucho mayor que el observado en las piezas de cistoprostatectomía realizadas para el tratamiento de tumores vesicales o, que el medido en los estudios de necropsia, ya que en estos últimos dos casos se trataría de carcinomas prostáticos latentes.

Lo que parece seguro es que el CP se compone de distintas líneas celulares, algunas de las cuales presentan un lento crecimiento mientras que otras tienen tasas de crecimiento más elevadas. Estos hallazgos se basan en el comportamiento que presentan los pacientes tratados mediante tratamientos expectantes, cuya evolución heterogénea, en muchos casos, sugiere la presencia de diferentes líneas celulares. Así mismo, también apoyan esta hipótesis los hallazgos de clones celulares altamente indiferenciados integrantes de pequeños volúmenes tumorales.

1.3. HISTOPATOLOGÍA

1.3.1. Histología de la próstata

La glándula prostática está formada por dos componentes: estroma y epitelio glandular. Estos componentes están delimitados por la cápsula prostática. El estroma rodea el epitelio y ambos tejidos interactúan entre sí mediante la secreción de andrógenos, hormonas esteroideas, citoquinas y reguladores del crecimiento, diferenciación y homeostasis. El epitelio glandular está formado por glándulas ramificadas y sus conductos. Epitelio y estroma están separados por una membrana basal, una capa de tejido conjuntivo y una capa de glucosaminoglicanos, polisacáridos y glucolípidos que forman la matriz extracelular. Dicha matriz tiene una función conectora y de comunicación (Nieto y cols., 2007; Cunha, 2008).

El estroma está formado por músculo liso, colágeno y fibroblastos. Contiene además terminales nerviosos, vasos sanguíneos y células infiltradas del sistema inmune.

El epitelio está formado por diferentes tipos celulares:

- ✚ Las células lumbinales secretoras. Son altas, con citoplasma pálido, las más abundantes en próstata normal y las más cercanas a la luz de la glándula. Son células diferenciadas que secretan antígeno específico prostático (PSA) y fosfatasa ácida prostática (PAP). También expresan altos niveles de receptores de andrógenos.
- ✚ Las células basales se sitúan por debajo de las células secretoras y neuroendocrinas (Figs. 2-3). Tienen forma fusiforme o fibroblástica y se orientan de modo paralelo a la base de la membrana de las células secretoras. Pueden identificarse por su reacción histoquímica con anticuerpos específicos para citoqueratinas de alto peso molecular (Molinie y cols., 2006; Man y cols., 2006; Ng y cols., 2007). Este tipo celular está menos diferenciado que las células secretoras y están casi desprovistas de productos de secreción tales como antígeno específico prostático y fosfatasa ácida prostática, aunque expresan receptores de estrógenos.
- ✚ Las células neuroendocrinas localizadas entre las células secretoras, se encuentran irregularmente distribuidas tanto por los conductos como por los acinos. Di Sant'Agnese y cols. (1992) han descrito dos tipos de células

neuroendocrinas: las abiertas y las cerradas. Las células neuroendocrinas abiertas tienen una morfología que les permite estar en contacto con la luz

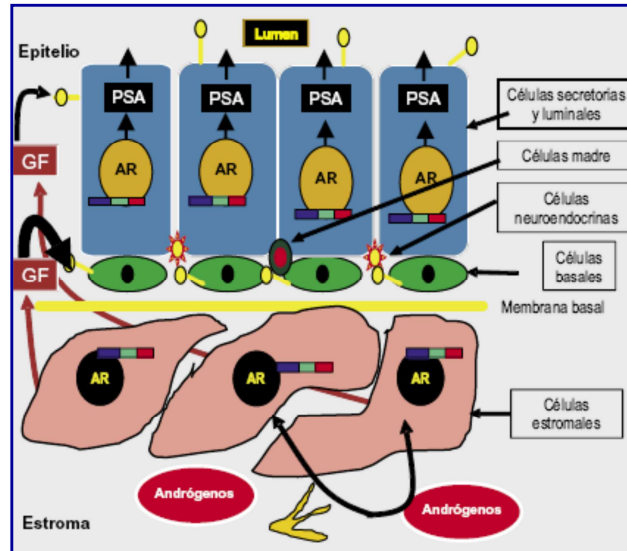


Figura 2. Esquema de la distribución y relaciones entre epitelio y estroma, (AR: receptor androgénico; PSA: Antígeno específico prostático; GF: Factores de crecimiento). Tomado de Uribe, 2005.

de la glándula. Las células cerradas no están en contacto con la luz de la glándula. La mayoría de estas células endo-paracrinas contienen serotonina aunque también pueden poseer calcitonina, katalcalcina (proteína semejante a la bombesina), somatostatina, gonadotropina coriónica humana y hormona estimulante del tiroides. Además, son positivas para Cromogranina A. Estas células co-expresan el antígeno específico prostático y fosfatasa ácida prostática. Derivan de las células de la cresta neural. Muy poco se conoce de su función, pero se especula que podrían jugar un papel muy importante en la regulación de la glándula prostática mediante liberación paracrina de péptidos que actúan sobre las células adyacentes (Lang y cols., 2009).

- Las células madre originarán los demás tipos celulares al diferenciarse (Sun y cols., 2009).

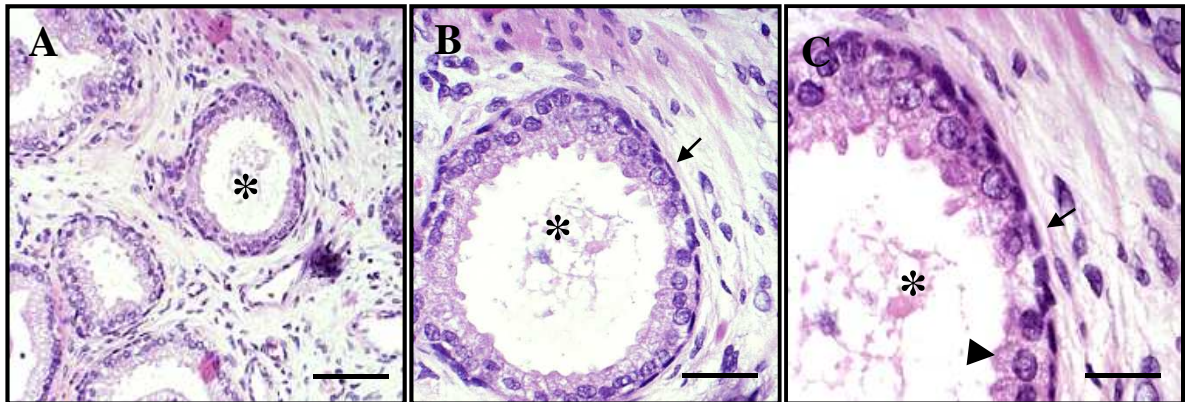


Figura 3. Próstata normal con tinción de Hematoxilina-Eosina. Asterisco: luz del acino. Flecha: célula basal. Punta de flecha: célula secretora. Barra: 40 µm (A), 20 µm (B) y 5 µm (C).

1.3.2. Otras patologías de la próstata

HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA

La Hiperplasia Benigna de Próstata (HBP) es una enfermedad que afecta al 50-80% de los hombres mayores de 50 años. Se caracteriza por una proliferación anormal de las células de la próstata en la zona de transición periuretral de la glándula (Emberton y cols., 2008). Este crecimiento permanente de la próstata conduce progresivamente a retención urinaria, disfunción renal e infección (González y cols., 2005).

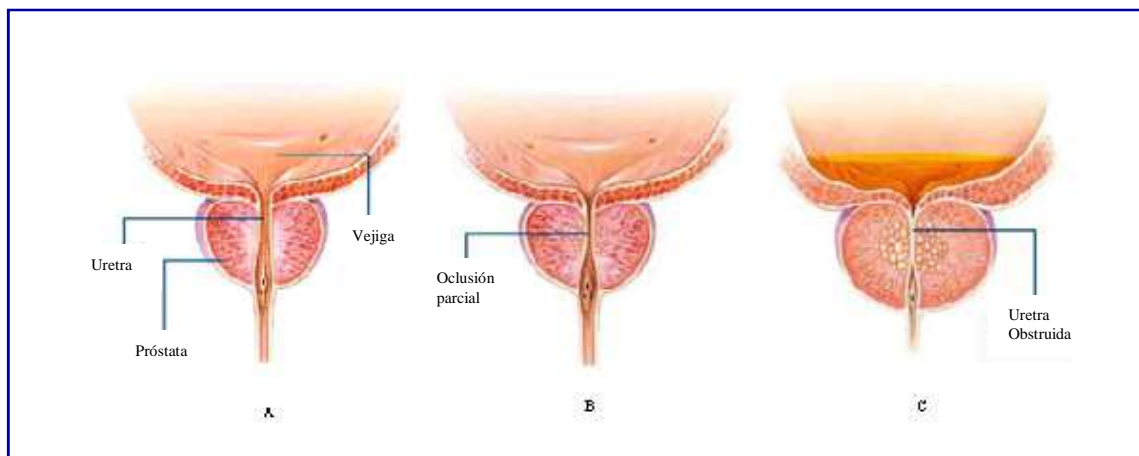


Figura 4. Desarrollo de hiperplasia benigna prostática. A: próstata normal, B: primera fase, C: segunda fase. Tomado de <http://www.nlm.nih.gov/>.

Factores de crecimiento, testosterona, dihidrotestosterona y estrógenos desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de esta patología (Roehrborn y Rosen, 2008) Participan en la regulación de la proliferación celular y la producción de la matriz extracelular en el estroma prostático. Eaton (2003) describe que en próstata normal existe un equilibrio entre factores de crecimiento: TGFB1 (Factor de crecimiento transformante-

β) que induce la producción de la matriz extracelular, suprimen la degradación de colágeno y la proliferación celular; FGF2 (Factor de crecimiento de fibroblastos); y, IGF-I/II (Factor de crecimiento semejante a la insulina, tipo I y tipo II), que ejercen una acción mitogénica en el compartimiento estromal. El equilibrio entre los factores de crecimiento y los inhibidores de éste mantiene el crecimiento normal de la glándula durante el desarrollo y la detención del crecimiento en el estado adulto. Cuando este equilibrio es alterado, se manifiesta esta patología.

La HBP, aunque no es considerada un estado premaligno, podría ser usada como un factor pronóstico de cáncer de próstata (Alcaraz y cols., 2009).

NEOPLASIA INTRAEPITELIAL PROSTÁTICA (PIN)

Se trata de una proliferación preneoplásica que suele darse en la zona periférica de la glándula prostática, conservando la estructura benigna de acinos y ductos. Se puede producir por daños repetidos en el epitelio produciendo un exceso de proliferación al intentar ser reparados, lo que en ocasiones conduce a daños irreversibles en el genoma. Así, se produce un incremento de células epiteliales con características intermedias entre las basales y secretoras. Algunos de estos cambios son irreversibles, dando lugar en numerosas ocasiones al cáncer (De Marzo y cols., 2007). Estudios recientes, muestran que se incrementa la secreción de enzimas proteolíticas que degradan la membrana basal, facilitando la invasión del estroma y en ocasiones, a otros tejidos (Kryczek y cols., 2009).

Inicialmente, Mc Neal y Bostwick (1986) describieron tres grados de PIN 1, 2 y 3, según la gravedad de las alteraciones del epitelio ductal. En la actualidad, hablamos de PIN de bajo grado (PIN 1) o bien PIN de alto grado (PIN 2 y 3) (Arzoz-Fábregas y cols., 2005). La similitud morfológica y molecular manifiesta el PIN de alto grado como precursor de cáncer de próstata (Bostwick y Qian, 2004; Joniau y cols., 2005).

En próstatas con carcinoma hay un incremento del tamaño y número de focos de PIN de alto grado, en comparación con las próstatas sin carcinoma. Igualmente al aumentar la cantidad de PIN de alto grado, aparecen más carcinomas multifocales (Dickinson, 2010). Varios estudios informan de un 23 a un 43% de riesgo de cáncer en las biopsias posteriores (Arzoz-Fábregas y cols., 2005). Sin embargo, no debemos olvidar que no es necesario que haya PIN para que surja un carcinoma.

1.4. CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.

1.4.1. Desarrollo y Evolución del cáncer

Como hemos descrito anteriormente la HBP y el PIN pueden ser factores biológicos de riesgo en la progresión del cáncer de próstata. Entre las posibles causas moleculares que influyen en el desarrollo se encuentran las mutaciones, pero también participan oncogenes y genes supresores tumorales (Ramsay y cols., 2009). Producen alteraciones que afectan a hormonas y citoquinas que en condiciones normales regulan los procesos normales de desarrollo, maduración y crecimiento tisular (Liu y cols., 2009).

En el 95% de los casos de cáncer de próstata corresponde a adenocarcinomas que se originan en las células secretoras de los acini y ductos prostáticos procedentes de las células basales. Topográficamente, su origen más común es en la zona periférica del epitelio glandular. El porcentaje minoritario restante de carcinomas de próstata, corresponde a tumores de estirpe epitelial (carcinoma transicional primitivo), estromal (rabortomiosarcoma o leiomiomasarcomas) o secundarios por contigüidad de órganos vecinos (vejiga o recto) o metástasis (melanoma, etc.) siendo excepcionales los casos de síndromes mieloproliferativos (linfomas, leucemia linfática crónica...) (van Bokhoven y cols., 2003).

1.4.2. Gradación histológica

El grado histológico se refiere al grado de anormalidad de las células cancerosas comparadas con las células normales. La evaluación del grado de diferenciación en el cáncer de próstata por el sistema Gleason (Gleason, 1966) ha adquirido progresiva consolidación desde que fuera inicialmente adoptada por el Veterans Administration Cooperative Urological Research Group (VACURG). Esta puntuación considera 5 grados o patrones de carcinoma prostático, básicamente por la capacidad de formación de glándulas y la delimitación del tumor, con respecto al tejido prostático adyacente y no afectado (Fig. 5).

- ✚ *Grado 1.* Microglándulas uniformes de distribución compacta con buena delimitación tumoral. Es poco frecuente. No se debe diagnosticar en biopsias, nódulo circunscrito o microacinos redondeados.
- ✚ *Grado 2.* Glándulas algo irregulares, más separadas y con peor delimitación tumoral.

- ✚ *Grado 3.* Mayor variación en el tamaño de las glándulas con mala delimitación tumoral, admitiendo patrones de crecimiento papilar y cribiforme.
- ✚ *Grado 4.* Glándulas fusionadas en masas de contornos infiltrantes. Hay una variante de células claras o de patrón hipernefroide.
- ✚ *Grado 5.* Forma poco diferenciada con poca o nula tendencia a formar glándulas (patrón sólido), a veces organizando masas con necrosis central.

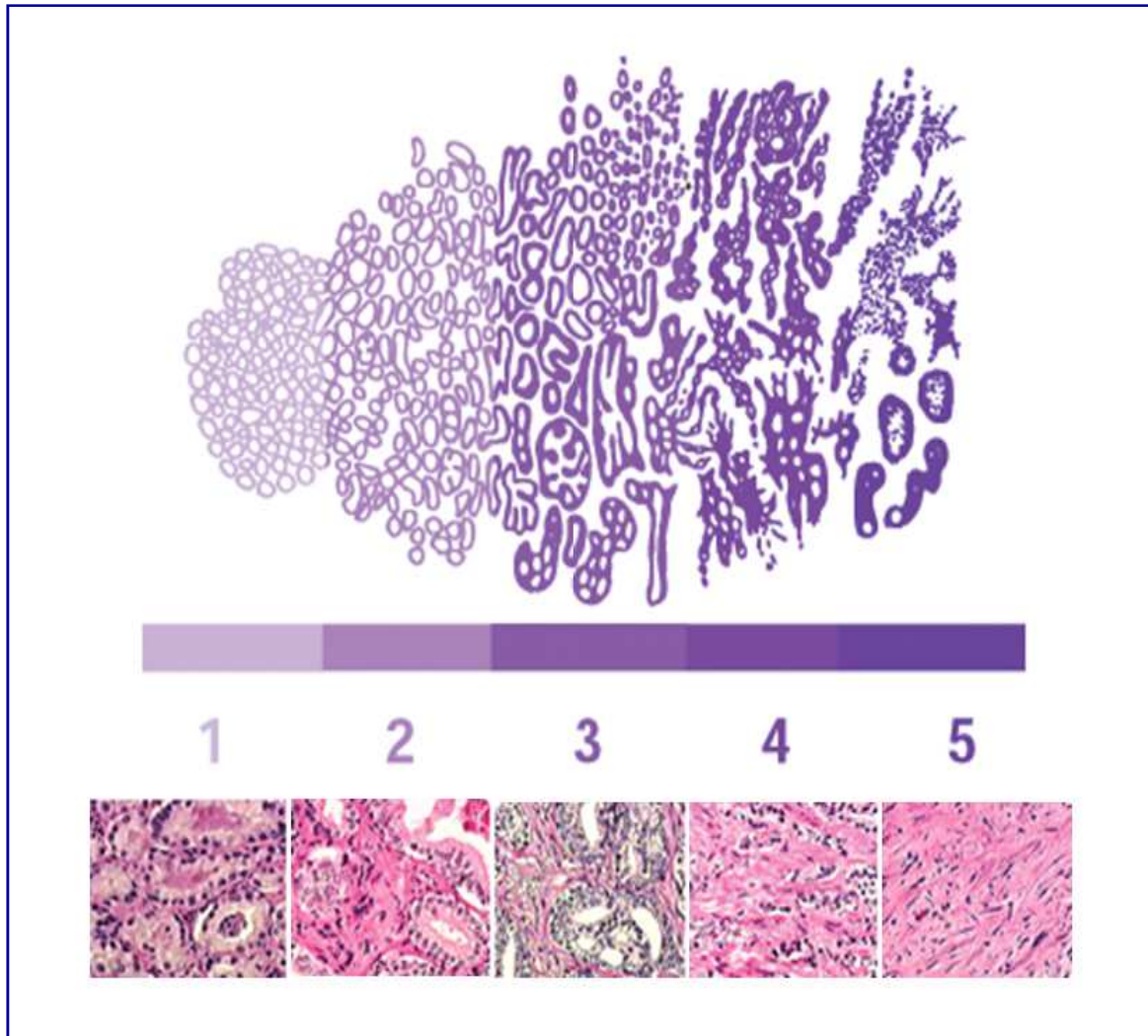


Figura 5. Esquema del sistema de puntuación Gleason. Tomado de <http://www.upmccancercenters.com/cancer/prostate/gradingsystems.html>

Este sistema asigna 2 grados a cada área tumoral basándose en los patrones principal y secundario de la diferenciación glandular del área estudiada. La puntuación de Gleason corresponde a los casos bien diferenciados para Gleason 2-6, moderadamente diferenciados en los Gleason 7, y pobremente diferenciados para los Gleason 8-10.

Los adenocarcinomas prostáticos bien diferenciados se caracterizan por grupos de glándulas pequeñas, con poco estroma circundante y pérdida de la capa celular

mioepitelial que rodea a las glándulas. Los adenocarcinomas moderadamente diferenciados poseen unos elementos glandulares más desorganizados y una anaplasia nuclear más pronunciada. Las glándulas también muestran infiltración de las glándulas normales circundantes, pudiendo adoptar un aspecto cribiforme. En los cánceres pobremente diferenciados hay una absoluta ausencia de diferenciación glandular y hay una presencia de cordones celulares infiltrando; además la anaplasia celular está acentuada (Bostwick y Cheng, 2008).

Además del Gleason, el estadio clínico y los niveles séricos de PSA representan variables preoperatorias importantes para predecir el estado anatomopatológicos del paciente (Arellano y cols., 2004).

1.5. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

1.5.1. Tratamiento del cáncer de próstata clínicamente localizado

Existen numerosas opciones terapéuticas para el cáncer de próstata cuya aplicación depende del pronóstico, y la decisión y condición de salud del paciente (Heidenreich y cols., 2011a).

Se sabe que la mayoría de los casos de cáncer de próstata no causarán la muerte del individuo debido a su lento crecimiento, de modo que la mayoría de los pacientes afectados morirán por otras causas distintas al cáncer prostático.

El tratamiento conservador del cáncer de próstata es razonable para hombres con una esperanza de vida de menos de 10 años, ya que es improbable que se beneficien y/o toleren un tratamiento agresivo (Bhatnagar y Kaplan, 2005). En aquellos pacientes con cáncer de próstata clínicamente localizado de bajo riesgo, la vigilancia activa (el tratamiento sintomático retrasado no curativo de pacientes que no son candidatos para una terapia local agresiva) se contempla como una opción terapéutica conservadora encaminada a reducir el sobretreatmento (Large y cols., 2009; Klotz y cols., 2010; Thompson y cols., 2010). Se ha visto que la vigilancia activa con tratamiento ante evidencia de un rápido incremento en niveles de PSA, o aumento de volumen o grado del tumor, está asociada con un bajo riesgo (3%) de muerte por cáncer de próstata (Klotz y cols., 2010).

La prostatectomía radical retropúbica constituye la opción terapéutica de primera línea en pacientes operables con malignidad localizada (Karnes y cols., 2010). Es el único

tratamiento que conlleva un beneficio en la supervivencia específica frente a la vigilancia activa (Bill-Axelsson y cols., 2005, 2008).

La privación androgénica neoadyuvante no confiere una ventaja en la supervivencia total ni en el tiempo libre de progresión y por tanto no tiene un papel en el tratamiento quirúrgico de la enfermedad (Shelley y cols., 2009). Sin embargo, los datos publicados sobre la terapia de privación androgénica adyuvante tras prostatectomía radical son contradictorios. Messing y cols. (2006) en un estudio retrospectivo aleatorizado, concluyen que existen ventajas en la supervivencia de pacientes con nódulos linfáticos positivo. En cambio, otros estudios no describen beneficios con la privación androgénica como terapia adyuvante tras la prostatectomía (McLeod y cols., 2006; Wong y cols., 2009).

La radioterapia postoperatoria inmediata podría mejorar significativamente la supervivencia clínica o biológica a 5 años en un 20% ($p < 0.0001$) (Bolla y cols., 2005; Thompson y cols., 2009; Wiegel y cols., 2009). Mientras que en hombres con cáncer de próstata de bajo riesgo y menos del 50% de núcleos de biopsia positivos el riesgo de implicación de ganglios linfáticos es bajo (Heidenreich y cols., 2011b). En hombres con tumores de riesgo intermedio y alto se debería siempre llevar a cabo linfadenectomía pélvica extensa al realizar la prostatectomía (Briganti y cols., 2006).

Hay diferentes tipos de radioterapia. La ajustada tridimensional es la modalidad de referencia. La radioterapia de intensidad modulada está siendo cada vez más utilizada (Heidenreich y cols., 2011a). En ella, la intensidad y frecuencia de la dosis de radiación a aplicar varía dependiendo del grupo de riesgo (Kupelian y cols., 2005; Peeters y cols., 2006; Bolla y cols., 2009; Jones y cols., 2011). La terapia de privación androgénica concomitante (con o sin neoadyuvancia) durante 3 años representa el estándar en el tratamiento radioterápico del cáncer de próstata de alto riesgo (Heidenreich y cols., 2011a). La braquiterapia se contempla también como una opción terapéutica segura y eficaz para pacientes de bajo riesgo (Ash y cols., 2000; Voulgaris y cols., 2008; Taira y cols., 2011).

1.5.2. Diagnóstico y Tratamiento del cáncer de próstata recidivante

Se conoce como recidiva bioquímica la elevación durante 2 veces consecutivas del valor de PSA sérico por encima de 0.2 ng/ml (Moul 2000. Boccon-Gibod y cols 2004. Stephenson y cols., 2006). Tras radiación como terapia definitiva, se considera recaída

cuando se registran valores séricos de PSA de 2 ng/ml por encima del nadir (Roach y cols., 2006).

Aunque en la mayoría de los varones con enfermedad clínicamente localizada la prostatectomía radical proporciona un excelente control del cáncer, aproximadamente un 35% de los pacientes experimenta elevación en los niveles de PSA (recaída o progresión bioquímica) dentro de un periodo de 10 años tras la cirugía (Catalona y cols., 1994; Trapasso y cols., 1994; Zincke y cols., 1994; Pound y cols., 1999). Un 34% de los pacientes que progresa desarrolla metástasis dentro de un periodo de 15 años tras la prostatectomía, en una mediana de 8 años tras la recaída bioquímica (Pound y cols., 1999). Una vez que el paciente desarrolla enfermedad metastásica el paciente muere debido a la enfermedad en una mediana de 5 años (Pound y cols., 1999).

La radioterapia proporciona un beneficio en cuanto a la recurrencia como terapia definitiva del cáncer de próstata clínicamente localizado (Stephenson y cols., 2004). En un estudio multi institucional con más de 4800 pacientes con cáncer de próstata clínicamente localizado tratados con radioterapia, se encontró que un 22-51% de los hombres con recurrencia bioquímica evidenciaba metástasis a los 5 años, y un 42-54% a 10 años, según el grupo de riesgo (Kuban y cols., 2003). En caso de progresión bioquímica tras eliminación quirúrgica de la próstata, se emplean dos estrategias terapéuticas: la radioterapia de emisión externa dirigida localmente y la terapia hormonal (Roberts y cols., 2009).

El uso de terapia hormonal como adyuvante (Sharifi y cols., 2005) tiene como objetivo es disminuir el efecto que tienen los andrógenos en el crecimiento del tumor prostático. En este sentido, como procedimiento simple de bajo riesgo, se realiza orquiectomía (castración quirúrgica) aunque poco a poco va siendo reemplazada por otras alternativas médicas (castración médica), de menor impacto físico y psicológico (Sharifi y cols., 2005). Así, existen diferentes medicamentos que disminuyen la acción androgénica y que difieren en su modo de acción. En la práctica clínica actual, el uso de agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es el medio de elección para conseguir niveles anorquídeos de testosterona en suero (Sharifi y cols., 2005; Harris y cols., 2009). La estimulación cíclica de la adenohipófisis por GnRH endógena estimula la liberación de la hormona luteinizante (LH), que a su vez estimula la síntesis de andrógenos. La administración continuada de agonistas de GnRH suplanta el efecto de la hormona endógena, y se cree que disminuye la expresión de sus receptores en la hipófisis, dando

lugar a niveles de testosterona de castración en tres semanas (Sharifi y cols., 2005). La administración de niveles elevados de estrógenos o progesterona resulta en una supresión similar en la liberación de LH a través de la retroinhibición del eje hipotalámico-hipofisario (Harris y cols., 2009). Antagonistas del receptor de andrógeno (como flutamida o bicalutamida) e inhibidores de la síntesis de andrógenos (como ketoconazol ó finasteride) son usados frecuentemente, solos o combinados con la castración, para bloquear el efecto de los andrógenos.

En pacientes con enfermedad sintomática metastática, se usan frecuentemente antagonistas del receptor de andrógenos al inicio o después de la terapia con agonistas de GnRH, para prevenir los efectos adversos de la elevación inicial de testosterona. La terapia androgénica tiene beneficio sobre la supervivencia total, el dolor óseo, la obstrucción ureteral, la compresión de la médula espinal y suprime los niveles de PSA en un 80-90% de los pacientes con cáncer de próstata metastático (Sharifi y cols., 2005; Harris y cols., 2009). No obstante también tiene efectos adversos, como la desmineralización ósea, incremento en el riesgo de fracturas (Shahinian y cols., 2005), sofocos (Holzbeierlein y cols., 2004) o la pérdida de la función sexual y la libido (Fowlery cols., 2002), entre otros (Sharifi y cols., 2005). Aunque es común una respuesta dramática inicial a la terapia, la privación androgénica se considera paliativa, ya que la enfermedad suele progresar a pesar de niveles anorquídeos séricos de testosterona (tumor resistente a la ablación androgénica) en una mediana de 2-3 años, sobrellevando la muerte a los 16-18 meses desde la progresión (Sharifi y cols., 2005; Pienta y cols., 2006).

Se han propuesto varios mecanismos que explican el surgimiento de tumores resistentes a la privación androgénica (Nelson y cols., 2003; Nieto y cols., 2007; Zhu y Kyprianou, 2008) como: a) amplificación génica del receptor de andrógenos (RA); b) mutaciones en el RA que permiten su activación por la unión de hormonas esteroideas no androgénicas; c) mutaciones en el RA que posibilitan su activación en ausencia de unión de ligando; d) síntesis de andrógenos por parte de las células cancerosas; e) activación del RA independiente de ligando, vía señalización mediada por citoquinas/factores de crecimiento (EGF, IL-6); f) estimulación de proliferación independiente del RA, vía señalización mediada por citoquinas/factores de crecimiento o desencadenada por mutaciones oncogénicas.

1.5.3. Factores Pronósticos del cáncer de próstata

Existen varios modelos predictivos aplicables a distintas etapas clínicas de la enfermedad que podrían ser útiles para: a) predecir la probabilidad de que un cáncer diagnosticado sea clínicamente insignificante (Kattan y cols., 2003); b) estimar la extensión de la enfermedad en el momento de la prostatectomía radical (tablas de Partin) (Partin y cols., 1997); c) determinar la probabilidad de recurrencia bioquímica después de la terapia (prostatectomía radical, radioterapia, braquiterapia) (Kattan y cols., 1998; 2000, 2001); d) evaluar la probabilidad de progresión a metástasis ósea y muerte tras fallo quirúrgico (Pound y cols., 1999). Algunos de estos factores son:

PUNTUACIÓN GLEASON.

Es un indicador importante e independiente del comportamiento del tumor. Se trata de un parámetro crucial en las tablas y nomogramas usados para guiar las decisiones clínicas en el tratamiento, como las tablas de Partin y los nomogramas de Kattan (Partin y cols., 1995; Kattan y cols., 1999). Los pacientes se agrupan usualmente en Gleason <7 (bajo riesgo), =7 (riesgo intermedio) y >7 (alto riesgo). Los pacientes con Gleason =7 son agrupados frecuentemente como de alto riesgo cuando así lo indican otros factores (Oefelein y cols., 1997; Steinberg y cols., 1997). Hay numerosas publicaciones que muestran que el Gleason 8-10 es un fuerte marcador pronóstico de recurrencia (Swanson y Basler, 2010). Así por ejemplo, Antonarakis y cols. (2011) encontraron que el tiempo libre de metástasis tras recurrencia bioquímica en pacientes con Gleason 8-10 (mediana = 4 años) es significativamente menor que en pacientes con Gleason 7 (mediana = 11 años) y Gleason 6-4 (mediana > 15 años).

PSA SÉRICO.

Al igual que ocurre con su utilidad en la detección, el valor predictivo del PSA no está claro. Stamey y cols. (2004) en un estudio realizado en hombres tratados con prostatectomía radical entre 1999 y 2003, describieron una mínima asociación entre PSA y el riesgo de enfermedad avanzada. Posteriormente varios trabajos mostraron una correlación significativa entre el PSA sérico, riesgo de enfermedad avanzada y progresión bioquímica después de prostatectomía radical (Freedland y cols., 2004, 2005; Antenor y cols., 2005). Freedland y cols. (2008) encontraron una correlación significativa entre

valores elevados de PSA preoperatorio y un aumento del riesgo de extensión extracapsular, implicación de márgenes quirúrgicos, invasión de vesícula seminal y recurrencia bioquímica tras prostatectomía. El tiempo de duplicación de PSA (es el tiempo para el cual se detecta un aumento del doble en los niveles de PSA comprendiendo al menos tres medidas separadas por un mínimo de tres meses cada una) se comienza a considerar como otro factor importante en la evaluación de nuevos casos diagnosticados de cáncer de próstata o de cáncer de próstata recurrente, y se ha usado también como un marcador de muerte específica de cáncer prostático (Eastham, 2005).

EXTENSIÓN EXTRAPROSTÁTICA.

Consiste en la presencia de glándulas neoplásicas fuera de la próstata, en el tejido periprostático. Este término fue aceptado por consenso en 1996, sustituyendo a otros como invasión extracapsular o extraglandular, penetración y perforación (Sakr y cols., 1996). La extensión extraprostática debe ser diagnosticada en: a) presencia de glándulas neoplásicas contiguas a, o en el interior de grasa periprostática; b) glándulas neoplásicas alrededor de nervios del paquete neuromuscular (posterolateralmente); c) presencia de extensión nodular del tumor más allá de la próstata o del estroma fibromuscular (Magi-Galluzzi y cols., 2011). La extensión extraprostática es un marcador pronóstico independiente de progresión bioquímica tras prostatectomía radical (Theiss y cols., 1995).

ESTATUS DEL MARGEN QUIRÚRGICO.

Se define margen quirúrgico positivo a la presencia de tumor extendiéndose a través de la superficie tintada que representa el lugar por donde el urólogo ha incidido para extirpar el tumor (Srigley, 2006; Epstein y cols., 2005). Se han descrito márgenes quirúrgicos positivos entre un 10 y un 48% de los pacientes tratados con prostatectomía radical, correspondiendo las tasas más bajas a las cohortes más recientes (Eastham y cols., 2003, 2007). Un margen quirúrgico positivo tiene impacto adverso en la probabilidad de supervivencia libre de progresión, tanto local como bioquímica, y en el desarrollo de metástasis tras prostatectomía radical en análisis multifactoriales (Blute y cols., 1997; Swindle y cols., 2005; Pfitzenmaier y cols., 2008; Alkhateeb y cols., 2010). El riesgo de progresión bioquímica con margen quirúrgico positivo tiene una razón de riesgo de 1.5-2.6 en comparación con un margen negativo (Blute y cols., 1997; Swindle y cols., 2005;

Simon y cols., 2006; Kench y cols., 2011). Sin embargo, la mayoría de los estudios sugieren que solo un tercio de los pacientes con margen quirúrgico positivo tendrá progresión bioquímica (Blute y cols., 1997; Swindle y cols., 2005; Simon y cols., 2006; Kench y cols., 2011).

METÁSTASIS EN NÓDULOS LINFÁTICOS.

La metástasis en nódulos linfáticos es un marcador pronóstico independiente y adverso bien establecido (Strigley y cols., 2006, Epstein y cols., 2005; Kench y cols., 2011). Es un componente de los nomogramas comúnmente usados para predecir el riesgo de recurrencia tras prostatectomía (Partin y cols., 1995; Kattan y cols., 1999). Los intentos de estratificar a los pacientes en grupos de riesgo basados en factores adicionales de la implicación de nódulos linfáticos ha dado lugar a resultados contradictorios (Kench y cols., 2011).

INVASIÓN DE VESÍCULA SEMINAL.

La vesícula seminal extraprostática podría estar afectada por carcinoma prostático a través de varios mecanismos: a) diseminación directa a través del complejo del ducto eyaculatorio; b) a través de la cápsula, diseminación por el tejido blando extraprostático hasta la vesícula seminal; c) por metástasis discontinua (Villers y cols., 1990; Ohori y cols., 1993; Potter y cols., 2000). Se han usado varias definiciones de invasión de vesículas seminales a lo largo de los años, complicando la comparación de los estudios publicados (Potter y cols., 2000). En el congreso de la International Society of Urological Pathology (ISUP) de 2009 se consensuó definirla como la invasión cancerosa de la pared muscular de la vesícula seminal exterior a la próstata Kench y cols. (2011). La invasión de la vesícula seminal se ha establecido como factor pronóstico independiente (Epstein y cols., 2005; Debras y cols., 1998; Tefilli y cols., 1998) y es componente de los nomogramas comúnmente usados para predecir el riesgo de recurrencia tras prostatectomía (Partin y cols., 1995; Kattan y cols., 2001). La presencia de metástasis en vesícula seminal confiere un riesgo de recurrencia solamente superado por la presencia de metástasis en nódulo linfático (Debras y cols., 1998; Tefilli y cols., 1998; Epstein y cols., 2000). La presencia invasión de vesícula seminal y margen quirúrgico positivo puede

influnciar la respuesta a radioterapia adyuvante (Potter y cols., 2000; Swanson y cols., 2008).

2-. HOMEOSTASIS TISULAR

En los órganos y tejidos de los seres vivos existen complejos mecanismos para mantener la homeostasis mediante la regulación de los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular. Del equilibrio entre las tasas de proliferación y muerte celular depende el crecimiento de cada órgano. Los estímulos que determinan, muerte o supervivencia llegan a la célula mediante la interacción de los receptores de superficie celular que reconocen sus ligandos en el medio (Schulze-Osthoff y cols., 1998).

La muerte de las células en los tejidos de los seres humanos y otros organismos multicelulares no siempre es anormal y no siempre significa un perjuicio. Esa muerte se produce principalmente por dos caminos: necrosis y apoptosis. Mientras que la necrosis se produce a través de una agresión celular externa, la mayoría de las células del cuerpo mueren de una manera más sutil, no inflamatoria y dependiente de energía, denominada apoptosis.1118

La necrosis es un proceso agudo y no fisiológico (por ejemplo un tejido infartado, la presencia de toxinas, hipoxia severa, etc.). Es una muerte pasiva, que ocurre después de una bajada aguda en los niveles de ATP. Se inactivan algunos canales iónicos dependientes de ATP permitiéndose una alteración de la homeostasis celular. La célula se hincha debido a alteraciones en los canales de Na^+ y Ca^{2+} , y a la entrada se agua. Se produce la ruptura de la membrana plasmática y el derrame del contenido celular, generando muerte de parte del tejido y principalmente inflamación (Jordan, 2003).

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo innato del propio organismo para eliminar las células que se han desarrollado de una forma inapropiada o en las que se ha producido un daño genético irreparable; hay situaciones en las que es un proceso patológico. Puede desencadenarse por agresión celular externa pero no es la agresión en sí lo que causa la muerte celular programada sino la iniciación del mecanismo interno de eliminación. Este es un mecanismo controlado, activo y dependiente de energía (Thompson, 1995; Rathmell y Thompson, 2002) que ocurre de forma habitual durante el desarrollo embrionario, la remodelación de tejidos, la regulación de la respuesta inmune y la regresión de tumores. Además contribuye en la eliminación de todas aquellas células que

surgen de un episodio de proliferación incontrolada y que favorecen la aparición tanto de hiperplasias como de neoplasias (Thompson, 1995; Zhivotovsky y Orrenius, 2003).

Las células que mueren por esta vía apoptótica se caracterizan por desarrollar una secuencia concreta de cambios morfológicos cuyo objetivo es evitar el daño a las células adyacentes. Por ello, las células apoptóticas mantienen íntegra su membrana plasmática, impidiendo así la salida al exterior de su contenido intracelular y la consiguiente respuesta inflamatoria. La membrana sufre alteraciones bioquímicas, como por ejemplo el cambio de localización de la fosfatidilserina que se transloca desde la cara interna de la membrana plasmática hasta la cara externa de ésta (Fadok y cols., 1992). Además, disminuye el volumen celular, facilitando la eliminación de restos celulares por células fagocíticas. La condensación citoplasmática ocurre por la pérdida de iones K^+ , Cl^- e iones orgánicos, que conlleva pérdida de agua (Maeno y cols., 2000). En este proceso el ADN de las células apoptóticas sufre una condensación y posterior fragmentación en unidades características de alto peso molecular (50 kpb) y otras de bajo peso molecular: la fragmentación internucleosomal (200 pb).

Sin embargo, el evento bioquímico más importante observado durante la apoptosis responsable de la mayoría de las alteraciones anteriormente mencionadas es la rotura específica de múltiples proteínas celulares, llevada a cabo por una familia de cisteín-proteasas denominadas caspasas. Estas proteínas se encargan del desmantelamiento celular, ya que desintegran el citoesqueleto y la lámina nuclear. Además, eliminan el contacto célula-célula, inhiben la replicación y las señales de supervivencia celular, y activan las endonucleasas. Una vez finalizado este proceso de autodigestión, los restos celulares quedan englobados por fragmentos de la membrana plasmática, formando los “cuerpos apoptóticos”. Posteriormente, y antes de su desintegración, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por células vecinas o del sistema inmune, impidiendo así una respuesta inflamatoria (Vaux y Dorsmeyer, 1999).

La apoptosis desempeña un papel primario en varios estados patológicos como son el cáncer, la neurodegeneración, autoinmunidad, enfermedades cardíacas y otros trastornos. El conocimiento de los caminos metabólicos seguidos por la apoptosis permitirá pronósticos más precisos y nuevos tratamientos de muchas enfermedades.

La próstata adulta normal se encuentra en un estado homeostático, producto del equilibrio entre las tasas de proliferación y muerte celular. El proceso apoptótico está controlado por factores inductores y represores. De esta forma, el balance entre éstos

determina si la célula sufre mitosis o apoptosis (Wyllie, 1992; Buja y cols., 1993). Según recientes hipótesis, en la fase previa al desarrollo de malignidad, se produciría un crecimiento exponencial debido a la alteración de este balance. Este crecimiento se produce cuando la tasa de proliferación excede a la tasa de muerte celular, o cuando la tasa de muerte cae por debajo de la tasa de proliferación celular.

Mediante la inhibición del camino apoptótico las células normales se desregulan proliferando casi continuamente, pudiendo llegar a la inmortalidad. Este proceso hace que la célula no tenga tiempo de detener su ciclo y reparar su ADN, pudiéndose generar mutaciones que conducen a la formación de un tejido tumoral.

En la regulación de todos estos procesos celulares principalmente participan *citoquinas, receptores hormonales, factores de transcripción, oncogenes y genes supresores de tumores*.

Es bien sabido que las interacciones entre las células del tumor y su microambiente pueden afectar al crecimiento del tumor y el desarrollo de metástasis. El microambiente tumoral depende del tipo de tumor y de sus diferentes etapas de desarrollo. Dentro de los factores que afectan al microambiente tumoral se han propuesto las citoquinas como importantes moduladores de estas interacciones, ya que pueden afectar al desarrollo y progresión del tumor (Ben-Baruch, 2003). Entre estas citoquinas, se encuentra el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la Interleukina-1 (IL-1), que van a estar relacionadas más directamente con diferentes rutas de transducción que finalizan con la activación de NF-kB.

3-. CITOQUINAS EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS CITOQUINAS

Las citoquinas son una familia de proteínas que han sido caracterizadas por estar involucradas en el control de la diferenciación, migración, activación y proliferación de células mieloides y linfoides. También son conocidas sus funciones en otros tejidos como regeneración tisular, angiogénesis, etc. En general sus características son:

- ✓ **PLEIOTROPÍA:** poseen diferentes efectos cuando actúan sobre diferentes células diana.
- ✓ **REDUNDANCIA:** varias citoquinas pueden ejercer un mismo efecto.
- ✓ **SINERGISMO:** varias citoquinas producen un efecto que se potencia mutuamente.

- ✓ **ANTAGONISMO:** los efectos de varias citoquinas se inhiben mutuamente.

La producción de estas citoquinas suele ser transitoria, limitada solo al tiempo que dura el estímulo. Suelen actuar a muy baja concentración, por lo que la afinidad de sus receptores suele ser bastante alta, del orden femtomolar (10^{-15}) o picomolar (10^{-12}). Pueden ejercer sus efectos de forma autocrina, paracrina y endocrina (Alberts y cols., 2010).

Uno de los criterios para clasificar las citoquinas es según sus propiedades funcionales predominantes, en este caso se distinguen cuatro grupos:

- Citoquinas de la inmunidad inespecífica o natural y con actividad proinflamatoria (IL-1 α e IL-1 β ; IL-6; Factor de Necrosis Tumoral o TNF- α ; IL-8 y otras quimiocinas; IL-17).
- Citoquinas que regulan la inmunidad específica (IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, IL-16, IL-4, IL-13, IL-6, IL-10, IL-14 e IFN- γ).
- Citoquinas con actividad antiinflamatoria e inmunodepresora (IL-4; IL-13 e IL-10; TGF- β ; interferones alfa y beta o IFN- α e IFN- β).
- Citoquinas que regulan la hematopoyesis (Stem Cell Factor o SCF, Factor Estimulador de Colonias Granulocito-Macrófago o GM-CSF, Factor Estimulador de Células Precursoras, Factor Estimulador de Macrófagos o M-CSF, Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos o G-CSF, IL-3, IL-5, IL-7, IL-9, IL-11 y

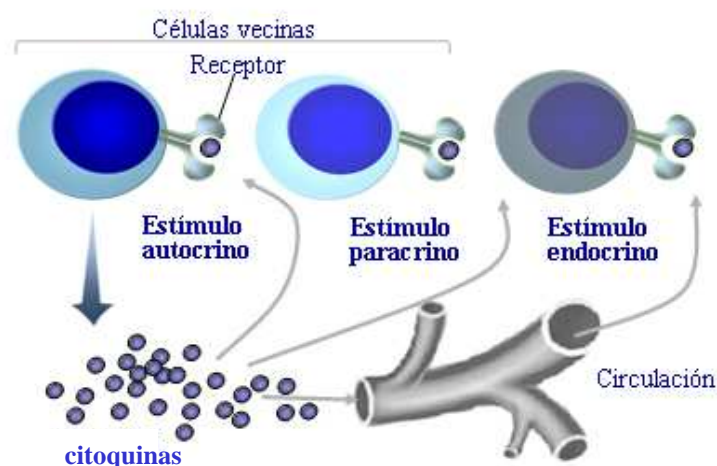


Figura 6. Efecto autocrino paracrino y endocrino de las citoquinas.

Eritropoyetina o EPO) (Kufe y cols., 2003)

Una vez producidas las citoquinas se unen a receptores específicos de la membrana de las células donde van a ejercer su función, iniciando una cascada de transducción intracelular de señal que altera el patrón de expresión génica, de modo que esas células blanco producen una determinada respuesta biológica (Alberts y cols., 2010).

3.2. RECEPTORES DE CITOQUINAS

Son proteínas de transmembrana de cadena sencilla y que se dividen en cinco grupos:

- ❖ Receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Poseen varios dominios extracelulares de tipo Ig. Forman parte de esta superfamilia los receptores de IL-1.
- ❖ Receptores de factores de crecimiento hemopoyéticos o CLASE I. Pertenecen a la familia de receptores alfa, beta y gamma. Se han reconocido en este grupo, las siguientes citocinas: IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, GM-CSF (factor estimulante de colonias granulocitos-monocitos) y G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos).
- ❖ Familia de receptores de interferones o familia de CLASE II. Tienen receptores alfa y beta. Ejemplos: interferón (IFN- α y - β) y el IFN- γ .
- ❖ Familia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral. Sus miembros se caracterizan por un dominio extracelular rico en cisteínas. Estarían en este grupo los ligandos de TNF- α , TNF-B, CD40.
- ❖ Familia de receptores de quimioquinas. Son proteínas integrales de membrana, con 7 hélices alfa insertas en la bicapa lipídica. Interaccionan, con la porción citoplasmática con proteínas de señalización triméricas (Proteína G) que unen GTP.

3.3. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α (TNF- α)

El Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), es una citoquina involucrada en inflamación, inmunidad y organización celular (Locksley y cols., 2001). Se aisló por primera vez en suero de ratones infectados con *Bacillus Calmette-Guérin* tratados con endotoxina (Carswell y cols., 1975).

TNF- α es una glicoproteína localizada en la superficie de la membrana celular, contiene 233 aminoácidos, pesa 26 kDa, es biológicamente activa y participa en la citotoxicidad e inflamación por interacción celular (Tracey, 1994; Ibelgaufts, 1995; Dinarello y Moldawer, 1999). La molécula de TNF- α soluble corresponde a una proteína de 17 kDa, con 157 aminoácidos, producida a partir del TNF- α procesada por cortes en el residuo 76 mediante la enzima convertasa del TNF- α (TACE), una metaloproteína que está también en la membrana celular. Estudios cristalográficos muestran que TNF- α está conformada por tres monómeros asociados no covalentemente y cuyo extremo N-terminal se encuentra expuesto en la superficie. Esta fracción N-terminal no parece importante en la interacción con el receptor (TNFR) (Tracey, 1994; Ibelgaufts, 1995; Dinarello y Moldawer, 1999).

En la década de los 80, también se caracterizó como una caquetina, identificada en conejos infectados con *Trypanosoma brucei*, y como un factor de diferenciación de linfocitos T (Takeda y cols., 1986). El gen de TNF- α se clonó en 1984, dando lugar a toda una década de experimentación clínica que culminó en la concesión de una licencia por parte de la Agencia de Evaluación de Medicina Europea para permitir su uso en el tratamiento del sarcoma inoperable (Lejeune y cols., 1998). Sin embargo, la terapia sistémica con TNF- α resultó inefectiva ya que la respuesta por parte del tumor desaparece con el tiempo causando serios efectos secundarios como son hipotensión y fracaso de órganos. Por todo ello, las investigaciones se redirigieron hacia formas alternativas centradas en la administración local del factor (Weichselbaum y cols., 2002).

La principal y más conocida acción biológica del TNF se ha descrito en el sistema inmunológico donde estimula el reclutamiento de neutrófilos y monocitos en los focos de infección así como la activación de estas células para erradicar microorganismos (Tracey, 1994).

En condiciones fisiológicas, forma un homotrímero de 55 kDa, no-covalentemente estabilizado. Posee 2 receptores de transmembrana, uno de 55 kDa (TNFR1 ó p55R ó CD120a) y otro de 75 kDa (TNFR2 ó p75R ó CD120b), que serían parte de una familia emergente de receptores. Producto de digestiones proteolíticas del dominio extracelular de TNFR1 y TNFR2 se generan dos tipos de receptores solubles (*TNF binding proteins*), que estarían involucrados en la regulación de los niveles circulantes de la citoquina (Chen y Goeddel, 2002; García-Tuñón y cols., 2006a).

Esta familia de receptores se caracteriza por tener múltiples regiones ricas en cisteínas, principalmente en su dominio N-terminal extracelular además de la presencia de dominios de muerte dentro de su estructura. Sus receptores presentan una alta promiscuidad molecular con respecto a sus ligandos. Generalmente, la distribución TNFR1 es mucho más amplia que la del TNFR2. La expresión de TNFR1 es constitutiva en muchos tipos de células, mientras que la expresión del TNFR2 se da de forma inducida. Ambos receptores participan de forma cooperativa o independiente en un amplio rango de respuestas celulares, como es el caso de proliferación, diferenciación, citotoxicidad o apoptosis (Dinarello y Moldawer, 1999). Generalmente se asocia TNFR1 con la inducción de muerte y TNFR2 con su inhibición o incluso con proliferación. Además, se han identificado formas solubles de ambos receptores (sTNFR) en fluidos biológicos que parecen afectar de alguna manera la actividad biológica y la biodisponibilidad sistémica de TNF- α (Dinarello y Moldawer, 1999). La cinética de interacción ligando-receptor para TNF- α difiere entre sus dos receptores. Mientras que TNFR1 se une de manera irreversible, TNFR2 presenta una asociación muy baja y una cinética (unión-liberación) muy rápida (Grell y cols., 1998).

TNFR2 podría estar desarrollando una función denominada “paseador del ligando” ya que puede “ligar” TNF- α y luego pasarlo a TNFR1 para potenciar la unión ligando-receptor y por lo tanto la acción de la propia citoquina cuando las concentraciones de TNF- α son muy bajas (Grell y cols., 1995, 1998; Dinarello and Moldawer, 1999).

A pesar del papel fisiológico descrito para esta citoquina, el aumento de sus niveles

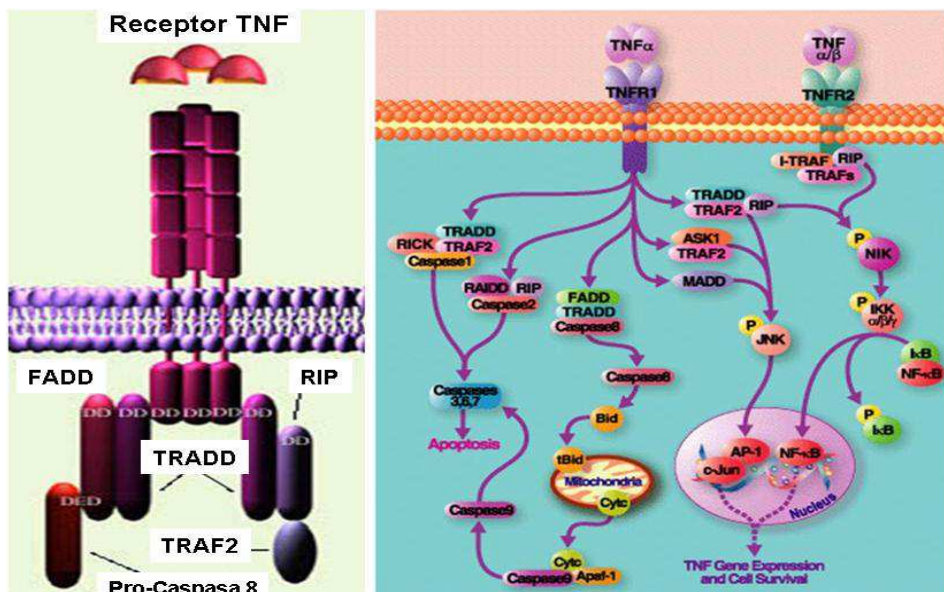


Figura 7. Receptores de TNF- α . Estructura general (A) (<http://bionmr-c1.unl.edu/TNFDD/TNFDD.htm>). Receptor I y II y sus diferentes vías de señalización (<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/signaling.html>).

se ha relacionado con la patogénesis de enfermedades asociadas al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), especialmente en aquellas con un componente inflamatorio y autoinmune, tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus insulino-dependiente o tipo 1, diabetes mellitus no-insulino dependiente o tipo 2 y obesidad asociada a insulino-resistencia, procesos infecciosos agudos como síndrome de shock séptico y crónicos como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Li y Lin, 2008).

TNF- α puede inducir la necrosis del tumor afectando la vascularización del mismo e iniciar la apoptosis, pero paradójicamente, también es capaz de promover la proliferación celular. Es capaz de producir la muerte de las células de varios tumores in vitro y posee efectos antitumorales in vivo (Aggarwal y cols., 2002; Li y cols., 2004). Estos efectos antitumorales de TNF- α incluyen la producción de proteínas proapoptóticas e inhibidoras del ciclo celular, entre los cuales está la activación de p53. Esto produce la parada del ciclo, reparación del ADN y la activación, a su vez, de p21, bax y bcl-2 (Miyashita y Reed, 1995; Chang y cols., 2002; Yamada y cols., 2004; Royuela y cols., 2008).

3.3.1. Mecanismos de acción de TNF- α

La maquinaria de transducción de TNF- α se compone de una gran cantidad de proteínas y adaptadores proteicos. La señal de transducción intracelular comienza con diferentes miembros de receptores de la familia de TNF, incluyendo los que van a activar factores de transcripción como son NF- κ B y AP-1 (May y Gosh, 1998; Royuela y cols., 2008), proteínas quinasas (p38 y JNK) (Schaeffer y Weber, 1999; Bubici y cols., 2004; Ricote., 2006; Sigala y cols., 2011) y proteasas (Salvesen y Dixit, 1997; Deep y cols., 2010; Moon y cols., 2010). Se han identificado diferentes proteínas adaptadoras capaces de iniciar la señalización intracelular, una familia de proteínas que contienen en su secuencia los denominados dominios de muerte (DD) que conectan a los receptores de muerte con las proteasas que activan a las caspasas necesarias para el desarrollo de apoptosis y otras proteínas que son generalmente quinasas. El dominio de muerte es un motivo de interacción proteína-proteína que consta de aproximadamente 90 residuos, altamente conservados (Huang y cols., 1996). Hay dos representantes de esta familia: FADD (Hsu y cols., 1996; Cohen, 1997) y TRADD (Hsu y cols., 1996).

Cuando TNFR1 interactúa con FADD se desencadena una apoptosis dependiente de caspasas pues interactúa con procaspasa-8 que se autocataliza liberándose la subunidad activa (caspasa-8) (Boldin y cols., 1996; Muzio y cols., 1996) la cual a su vez

activa caspasa-3 y esta última va a promover la activación de diferentes endonucleasas y proteasas que fragmentarán a diferentes niveles la hebra de ADN (Cohen, 1997).

FADD (Mort1) o proteína que se asocia al dominio de muerte de Fas, tiene la habilidad de asociarse sólo con Fas (Boldin y cols., 1995; Chinnaiyan y cols., 1996). Más tarde, se observó que determinadas mutaciones de FADD producían la inhibición de la apoptosis inducida por TNF- α , Fas y DR3 pero no la activación NF- κ B, concluyéndose que la activación de NF- κ B y el desarrollo de la apoptosis eran fenómenos separados (Yeh y cols., 1998; Zhang y cols., 1998; Parrondo y cols., 2010).

TRADD (TNF receptor-associated DD) es un componente esencial en el complejo TNFR1 y su función consiste en reclutar otros miembros del complejo del receptor. Cuando TNFR1 se une al TNF, éste se trimeriza permitiendo la formación de TRADD, el cual se asocia al dominio de muerte y sirve como plataforma para unir varias moléculas incluyendo: FADD (*Fas-associated DD*), TRAF-2 y RIP (*receptor-interacting protein*) (Tsao y cols., 2007).

Los factores asociados a receptores de factor de necrosis tumoral (TRAFs) son una familia de proteínas que poseen un dominio estructural común en su extremo carboxilo-terminal. Esta región conservada permite a TRAFs interactuar con receptores de superficie de otras moléculas señales (Bradley y Pober, 2001).

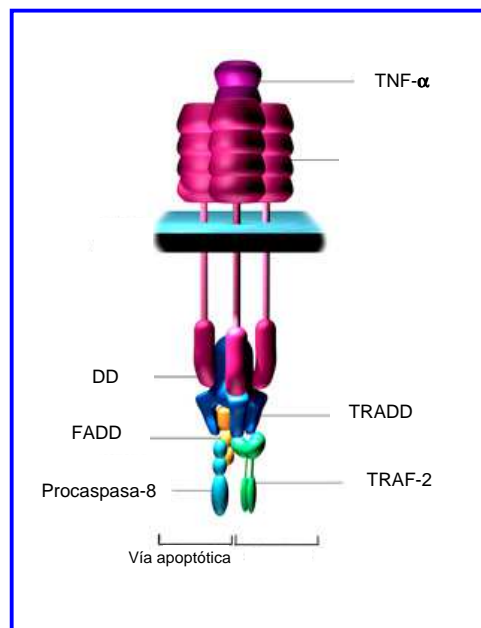


Figura 8. Esquema del receptor I de TNF- α y proteínas asociadas. Tomado de <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology>.

La familia de las proteínas TRAF se compone de 6 miembros que, excepto TRAF-4, contienen un dominio de anillo y de dedo de zinc en sus extremos N- y C-terminal que parecen ser los responsables de la asociación entre ellas y de la interacción con otras proteínas. Para la interacción de TRAF-1, TRAF-2 y TRAF-5 con varios dominios citoplasmáticos de los receptores de la familia TNF se requiere de una región específica en el receptor (que es PXQXT). A diferencia de estas moléculas, TRAF-6 reconoce un motivo diferente (que es QXPXE) que se ha identificado únicamente en los receptores CD40 y RANK (Pullen y cols., 1999; Rowland y cols., 2007). TRAF-2, TRAF-5 y TRAF-6 son capaces de activar JNK y NF- κ B (Pullen y cols., 1999; Liang y cols., 2010). En la actualidad se está describiendo el papel fisiológico que desempeñan estas proteínas en las diferentes cascadas de señalización iniciadas por TNF y cabe destacar que dentro del pool de proteínas descritas las más relevantes son TRAF-2, FADD, caspasa 8 y FAN.

TRAF-2 es esencial en la activación de JNK y NF- κ B por TNF- α . En un principio se describió como una proteína que promovía la activación de NF- κ B pero más tarde, mediante experimentos de sobreexpresión en cultivos celulares, se llegó a la conclusión de que era también necesaria para la activación de JNK (Lee y cols., 1997; Royuela y cols., 2008).

TRAF-6 inicialmente fue identificada como una señal de transducción para IL-1. Se ha descrito que TRAF-5 y TRAF-6 median en la activación de NF- κ B y JNK. La proteína TRAF-6 funciona como señal de transducción en la vía de NF- κ B que activa I κ k en respuesta a citoquinas proinflamatorias (Bradley y Pober, 2001).

RIP o proteína de interacción con el receptor fue identificada como una proteína que se asociaba al dominio de muerte (DD) de Fas, por lo que tendría un papel más relevante en la inducción de apoptosis a través de Fas que en la activación de NF- κ B inducida por TNF- α (Devin y cols., 2003; Lee y cols., 2004; Li y Lin, 2008).

3.4. INTERLEUQUINA 1 (IL-1)

IL-1 es una familia de glicoproteínas descrita en la década de los 40. Participa en procesos inflamatorios aunque también puede actuar promoviendo el crecimiento celular (Voronov y cols., 2003). La familia de IL-1 esta formada por: IL-1 α , IL-1 β , IL-1RI, IL-1RII e IL-1Ra (el receptor antagonista de IL-1) (Dinarello, 1996).

Tanto IL-1 α como IL-1 β son sintetizadas como precursores con un peso molecular de 31 kDa. Tras el procesamiento, mediante proteasas específicas del precursor, se genera la proteína madura que, en ambos casos, tendrá un peso molecular de 17 kDa. En cambio, IL-1Ra posee en su estructura molecular un péptido señal que facilita el transporte rápido fuera de la célula y se denominada sIL-1Ra por ser una forma soluble (Kong y cols., 2006).

A su vez, la familia de la IL-1 tiene dos receptores: tipo I (IL-1RI) y el de tipo II (IL-1RII). IL-1RII es incapaz de iniciar una señal de transducción. La función de IL-1RII consiste en retener moléculas de IL-1 β , por ello se le denomina “receptor señuelo” (decoy) (Colotta y cols., 1994; Apte y cols., 2006). Cuando IL-1 se une a IL-1RI se forma un complejo al que se unirá la proteína accesoria de IL-1 (IL-1R-AcP), formándose un complejo de unión de alta afinidad (Greenfeder y cols., 1995; Apte y cols., 2006).

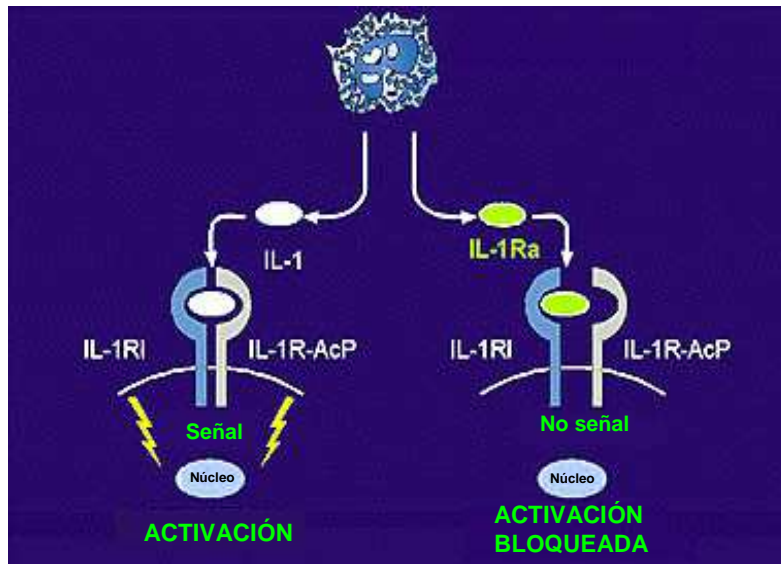


Figura 9. Unión de IL-1 con su receptor IL-1RI (Traducido de Bresnihan, 2001).

3.4.1. Receptores de IL-1

Se ha descrito una amplia familia de receptores IL-1, abarcando al menos nueve miembros en la familia. Todos los miembros de la familia poseen tres inmunoglobulinas (Ig) como dominios en su región extracelular. Con la excepción de IL-1R2, todos los miembros de la familia también tienen un dominio intracelular (TIR *Toll-like receptor/IL-1 R signaling*). Seis de los miembros de la familia IL-1R (IL-1R1, R2, R4, R5, R6 y R7) están relacionados y localizados en el cromosoma 2. El receptor IL-1R3 está localizado en el cromosoma 3, IL-1R8 y IL-1R9 están localizados en el cromosoma X (Boraschi y

Tagliabue, 2006). De ellos, sólo IL-1RI e IL-1RII tienen como ligando a IL-1 α , IL-1B e IL-1Ra (Ricote y cols., 2004).

IL-1RI es una glicoproteína de 80 kDa que se encuentra en células endoteliales, de músculo liso, epiteliales, hepatocitos, fibroblastos, queratinocitos, dendríticas epidérmicas y linfocitos T (Mancilla y cols., 1992). Las células que responden a la presencia de IL-1 presentan principalmente IL-1RI en la superficie celular ya que es el receptor biológicamente activo (Rosoff y cols., 1988; Voronoc y cols., 2007). Este receptor está formado por un segmento de transmembrana y un dominio citoplasmático. Este dominio citoplasmático aparentemente carece de actividad tirosin-quinasa intrínseca, pero cuando IL-1 se une a un número bajo de receptores se produce su fosforilación, por la participación de algún miembro de la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Gallis y cols., 1989).

IL-1RII unido a la membrana celular no parece formar complejo con IL-1RI (Gallis y cols., 1989; Slack y cols., 1993) y no traduce señal intracelular (Sims y Dower, 1994; Sims y cols., 1993; Dower y cols., 1994). La unión a IL-1RII evita que IL-1 se una a IL-1RI, o al menos lo hace en menor cantidad, lo que previene que se desencadene la señalización intracelular y la consecuente respuesta (Colotta y cols., 1993; Voronoc y cols., 2007). Algunas veces la porción extracelular del receptor de tipo II es proteolizada y se produce la aparición del llamado IL-1sRII, que es la forma soluble del receptor de tipo II pudiendo aparecer en los fluidos orgánicos. También es posible encontrar IL-1RI soluble en individuos saludables aunque aparece en una concentración 10 veces menor a la de IL-1RII (Orencole y cols., 1995).

La afinidad de los dos receptores por los diferentes tipos de IL-1 no es la misma. IL-1RI presenta una afinidad mayor por IL-1Ra y por IL-1 α que por IL-1B mientras que IL-1RII tiene mayor afinidad por IL-1B que por IL-1 α e IL-1Ra (Boraschi y cols., 1996; Voronoc y cols., 2007).

La unión de IL-1 al receptor de membrana va a desencadenar una serie de cambios bioquímicos asociados a una cascada de transducción que en su mayoría son específicos de cada tipo celular. En algunos tipos celulares IL-1 se ha considerado como un factor de crecimiento cuya señalización intracelular esta asociada a la fosforilación de ERK (Huwiler y Pfilschifter, 1994), p38 (Freshney y cols., 1994) o NIK (Nuñez y cols., 2008).

3.5. SEÑAL DE TRANSDUCCIÓN ANTI-APOPTÓTICA/ SUPERVIVENCIA (NF-kB)

El factor nuclear kappaB (NF-kB) desempeña una función central en inflamación y promueve la expresión de genes implicados en algunos aspectos del cáncer como supervivencia, proliferación y control del ciclo celular, angiogénesis e invasividad. Por tanto, NF-kB podría proporcionar un nexo mecánico entre inflamación y cáncer, como componente clave de vías de señalización extracelular desencadenadas por agentes infecciosos, citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 ó TNF- α), factores de crecimiento y señales “de peligro” liberadas por células necróticas (Karin, 2006; Royuela y col., 2008). Cuando TNF- α llega a la superficie celular se forma el complejo TRADD/ TRAF-2, se produce la activación de Ikk (quinasa del inhibidor del factor-kB), para lo que es necesaria la presencia del factor RIP (proteína que interacciona con el receptor). Sin embargo, la activación de Ikk, también puede ocurrir por la activación de la IL-1 sobre IRAK/ TRAF-6 (Stylianou y Saklatvala, 1998; Jackson-Bernitsas, 2007; Nuñez y cols., 2008). El complejo quinasa de Ikb (Ikk), está constituido por las subunidades catalíticas Ikk- α e Ikk-B, y la subunidad reguladora Ikk γ . En condiciones normales NF-kB se encuentra retenido en el citoplasma junto con Ikb (inhibidor del factor-kB) formando el complejo Ikb/ NF-kB (Beg y Baltimore, 1996; Palkowitsch y cols., 2008). Para que se produzca la activación de NF-kB es necesaria la fosforilación de Ikb por la quinasa Ikk produciendo la separación del

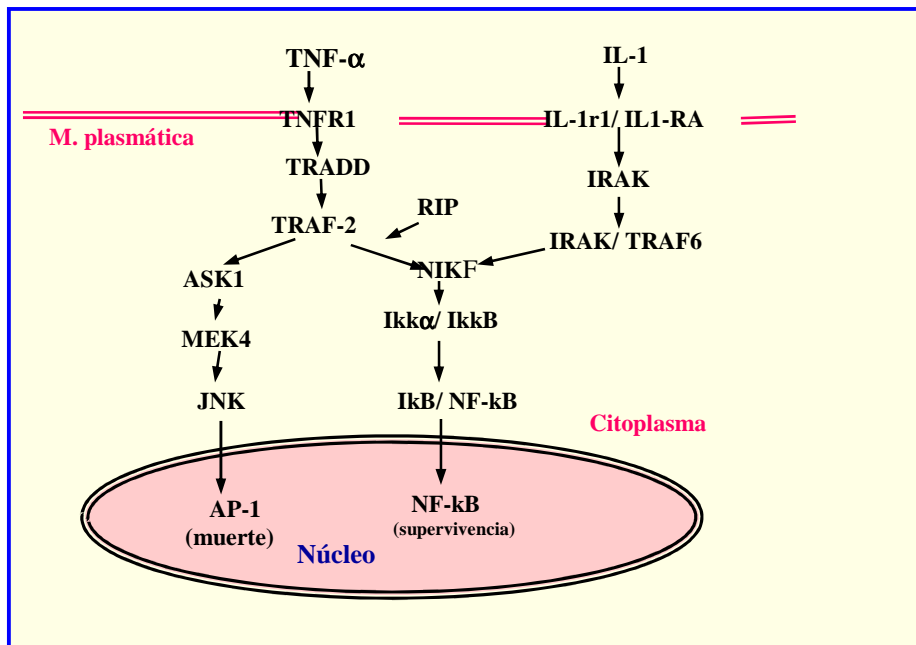


Figura 10. Ruta de transducción del TNF- α / IL-1.

complejo, NF- κ B penetra en el núcleo actuando de factor de transcripción de una gran variedad de genes como son bcl-2, bcl-xl (Tamatani y cols., 1999; Luqman y Pezzuto, 2010) e IAPs (proteínas inhibidoras de la apoptosis) (Luqman y Pezzuto, 2010). I κ B sufre ubiquitinación y se degrada en el proteosoma (Chopra y cols., 2004).

NF- κ B/Rel es una familia génica cuyos miembros comparten Dominio de Homología a Rel (Rel Homology Domain, RHD) y que comprende cinco miembros: NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), c-Rel y RelB (Ghosh y Karin, 2002). NF- κ B1 and NF- κ B2 se sintetizan como moléculas precursoras, respectivamente de p105 y p100, las cuales, tras experimentar un procesamiento proteolítico dan lugar a las formas maduras p50 y p52 (Karin y Ben-Neriah, 2000). Los factores de transcripción NF- κ B funcionales son dímeros formados por prácticamente cualquier combinación de los cinco miembros de la familia. Aunque todas las subunidades contienen el dominio RHD de unión a DNA, solo p65, c-Rel, RelB, pero no p50 o p52, poseen el dominio C-terminal de transactivación. Por tanto, solamente los dímeros p50/p65, p50/c-Rel, p65/p65, y p65/c-Rel son transcripcionalmente activos, mientras que los homodímeros de p50 y p52 actúan como represores de la transcripción (Neumann y cols., 2007).

4-. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El cáncer de próstata, es una de las enfermedades malignas más comúnmente diagnosticadas en varones. Los factores etiopatológicos son diversos y dada su elevada incidencia, es imprescindible el desarrollo de terapias utilizables en el tratamiento precoz de dicha patología. Aunque se han realizado significativos avances y nomogramas diagnósticos, es necesario profundizar más en aspectos histológicos-moleculares que nos permitan predecir el estadio local del carcinoma, así como identificar y conocer todos los factores relacionados con la progresión de dicha patología. PSA es un marcador órgano-específico, con alta sensibilidad pero baja especificidad para la detección del cáncer de próstata, existiendo situaciones que provocan una elevación temporal de sus niveles no relacionados con procesos tumorales como pueden ser manipulaciones de la glándula prostática (tacto rectal o biopsias) (Polascik y cols., 1999) y enfermedades benignas (hiperplasia) (Bozeman y cols., 2002; Alapont y cols., 2008). Además, se han observado niveles normales en pacientes con patología tumoral. Así, PSA no es indicativo del grado de evolución de la enfermedad (Roddam y cols., 2005; Alapont y cols., 2008). Sería necesario encontrar nuevos marcadores pronósticos que, junto con el PSA, aumentaran la especificidad diagnóstica de la enfermedad. El desarrollo del cáncer implica una serie de cambios homeostáticos en los tejidos que afectan a los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular (Sensibar y cols., 1995). En los últimos años, se cree que citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , que activan importantes rutas de transducción celular, podrían estar relacionadas con la carcinogénesis. Los datos bibliográficos encontrados hasta este momento en próstata no indican los procesos que está favoreciendo TNF- α , pero teniendo en cuenta resultados recientes en otros tejidos, en los cuales esta citoquina parece favorecer procesos proliferativos y la progresión del cáncer, planteamos que **TNF- α en próstata podría estar sobreactivando la ruta de transducción de supervivencia mediada por el factor de transcripción NF-kB en detrimento de la ruta proapoptótica mediada por AP-1, como se demostró en trabajos anteriores (Núñez y cols., 2008). Sí esto fuera así, NF-kB y sus activadores podrían ser considerados como dianas terapéuticas.** Por ello, nos planteamos profundizar en la dualidad de TNF- α en la glándula prostática en situación normal y cáncer mediante el estudio de las diferentes rutas de transducción que desencadena su llegada a la superficie celular. Este factor de transcripción actúa mediante la inducción de PSA, bloqueo de la expresión del receptor de

andrógenos, etc. La correlación de los datos de inmunohistoquímica con niveles de PSA (pre- y post- operatorio), Gleason, presencia de metástasis, situación de los márgenes quirúrgicos, recidivas y supervivencia del paciente a los cinco años de la prostatectomía; podría ayudar a predecir las posibles recidivas tras la prostatectomía radical, así como encontrar algún factor pronóstico de la evolución de la malignidad.

OBJETIVOS

1.- Determinar las variaciones de expresión y distribución mediante inmunohistoquímica de TNF- α e IL-1 así como sus receptores, en los tres grupos de pacientes con cáncer (Gleason bajo, medio y alto) en comparación con aquellos que presentan una próstata normal.

2.- Testar las variaciones en cuanto expresión, activación y localización de las proteínas implicadas en las rutas de transducción iniciadas por TNF- α y/o IL-1, mediante inmunohistoquímica y Western blot en próstata normal y cáncer de próstata, con la finalidad de conocer si la señalización intracelular desencadenada está mediada NIK.

3.- Correlacionar los resultados obtenidos en inmunohistoquímica con datos clínicos, como son niveles de PSA (pre- y post- operatorio), Gleason, presencia de metástasis, situación de los márgenes quirúrgicos, recidivas y supervivencia del paciente a los cinco años de la prostatectomía.

4.- Encontrar algún factor pronóstico, que junto a PSA nos ayude a predecir posibles recidivas tras la prostatectomía radical, y por tanto, la evolución de la malignidad.

II.MATERIAL Y MÉTODOS

1.- MATERIALES

1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1.1. MUESTRAS

Se utilizaron muestras de próstata humana, procedentes del Hospital Príncipe de Asturias (Alcalá de Henares, Madrid), obtenidas mediante prostatectomía radical, resección transuretral y autopsias. Todas las muestras incluidas en el estudio fueron diagnosticadas clínica e histológicamente en el servicio de Anatomía Patológica, y su utilización fue aprobada por el Comité Ético del Hospital.

El material usado fue:

1.- 20 próstatas histológicamente diagnosticadas como normales (PN), obtenidas de autopsias (8-10 horas después de la muerte).

2.- 93 próstatas procedentes de varones (de 51-74 años) diagnosticados de cáncer de próstata (CP), a los que se les había practicado prostatectomías radicales o bien resecciones transuretrales. Estas muestras a su vez, se dividieron en tres subgrupos: bajo (21 muestras), medio (51 muestras) y alto (21 muestras) puntuación (grado) Gleason.

Tras la revisión de la historia clínica, se comprobó que los pacientes no habían recibido terapia hormonal antes de la cirugía ni habían desarrollado metástasis.

Cada una de las muestras se dividió en dos porciones de igual tamaño. Una de ellas se congeló en nitrógeno líquido y fue mantenida a -80°C para realizar las técnicas de Bradford y Western blot. La otra porción se procesó para técnicas de microscopía óptica.

1.1.2. ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS (TABLA 1)

Tabla resumen de anticuerpos usados en las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) y Western blot (WB), diluciones utilizadas y sus correspondientes pesos moleculares (Pm).

Anticuerpo	Tipo de anticuerpo	Casa comercial	IHQ	WB	Pm (kDa)
TNF-α	Policlonal cabra	SANTA CRUZ ¹	1/50	1/200	17
TNFR1	Policlonal cabra	SANTA CRUZ	1/50	1/200	55
TRAF-2	Monoclonal ratón	SANTA CRUZ	1/25	1/500	52
IL-1α	Policlonal conejo	SANTA CRUZ	1/25	1/500	17
IL-1B	Policlonal conejo	SANTA CRUZ	1/25	1/500	17
IL1-Ra	Policlonal cabra	SANTA CRUZ	1/25	1/500	17
IL-1RI	Policlonal conejo	SANTA CRUZ	1/25	1/500	80
IL-1RII	Monoclonal ratón	R&D SYSTEM ²	1/200	1/1000	68
IRAK-1	Policlonal conejo	SANTA CRUZ	1/100	1/500	70
TRAF-6	Monoclonal ratón	SANTA CRUZ	1/50	1/250	60
RIP	Policlonal conejo	SANTA CRUZ	1/50	1/100	74
NIK	Monoclonal ratón	SANTA CRUZ	1/100	1/100	130
Ikkα/IkkB	Policlonal conejo	SANTA CRUZ	1/50	1/250	85
p-Ikkα/B	Policlonal conejo	SANTA CRUZ	1/50	1/250	85
IkB	Monoclonal ratón	SANTA CRUZ	1/50	1/100	37
p-IkB	Monoclonal ratón	SANTA CRUZ	1/50	1/250	37
NF-kB (p50)	Monoclonal ratón	SANTA CRUZ	1/25	1/250	50
NF-kB (p65)	Monoclonal ratón	SANTA CRUZ	1/25	1/250	65
α-Actina	Monoclonal ratón	AMERSHAM ³	1/4000	1/10000	40

¹ Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA.

² R&D Systems Inc, Minneapolis, USA.

³ Amersham, Buckinghamshire, UK.

1.1.3. ANTICUERPOS SECUNDARIOS UTILIZADOS (TABLA 2)

Anticuerpo	Origen	Casa Comercial	IHQ*	WB#
Anti-raton	Conejo	DAKO ¹	1/500	1/4000
Anti-conejo	Ratón	DAKO	1/500	1/4000
Anti-cabra	Cerdo	DAKO	1/500	1/4000

¹ DAKO, Barcelona, España.

* Anticuerpos unidos a biotina.

Anticuerpos unidos a peroxidasa.

2.- MÉTODOS**2.1. WESTERN BLOT****2.1.1. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA PARA WESTERN BLOT**

Las muestras congeladas en nitrógeno líquido se mantienen a -80°C hasta el momento de la extracción proteica. Las muestras se homogenizan en un homogenizador con 200 µl de solución de homogenización (junto con inhibidores de proteasas y fosfatasas) por cada 100 mg de tejido fresco.

Los homogenizados se tienen 30 minutos en hielo para facilitar la disociación de los complejos nucleoproteicos.

Se centrifuga a 11000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

A continuación, se determina la concentración proteica de la solución con el método Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca).

Método Bradford

Para la valoración proteica de cada una de las muestras se utilizó una curva patrón entre cuyos valores se encuadran las concentraciones de nuestras muestras. La curva patrón se realizó con las cantidades indicadas en esta tabla (Tabla 3).

Nº	BSA	H₂O	R. Bradford
0	0	800 µl	200 µl
1	10 µl (2 µg)	790 µl	200 µl
2	40 µl (8 µg)	760 µl	200 µl
3	50 µl (10 µg)	750 µl	200 µl
4	90 µl (18 µg)	710 µl	200 µl
5	110 µl (22 µg)	690 µl	200 µl
6	150 µl (30 µg)	650 µl	200 µl
7	250 µl (50 µg)	550 µl	200 µl
8	350 µl (70 µg)	450 µl	200 µl

Para las muestras a valorar se añade 1 µl de la muestra, 799 µl de agua destilada y 200 µl de reactivo Bradford, también se hacen por triplicado. A continuación se mide cada muestra en el espectrofotómetro (Perkin Elmer, Lambda Bio UV/VIS Spectrometer) a una longitud de onda de 590 nm. Este espectrofotómetro realiza automáticamente la curva patrón y por extrapolación nos facilita también la concentración de proteína de la muestra problema en µg/µl.

2.1.2. ELECTROFORESIS

Se equilibraron las muestras de tal forma que se ponían 20 µg de proteína en 15 µl de tampón de carga y se hirvieron durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron durante otros 5 minutos a 11000 rpm.

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida, usando tampón de electroforesis, con un gradiente variable de 9-15% (dependiendo del peso molecular de la proteína objeto de estudio) a un voltaje constante de 160 V. En cada gel se reservaba el primer pocillo para los marcadores de peso molecular. Anteriormente estos pesos moleculares (LIFE SCIENCE Full Range Rainbow, Amershan) se hirvieron durante 5 minutos.

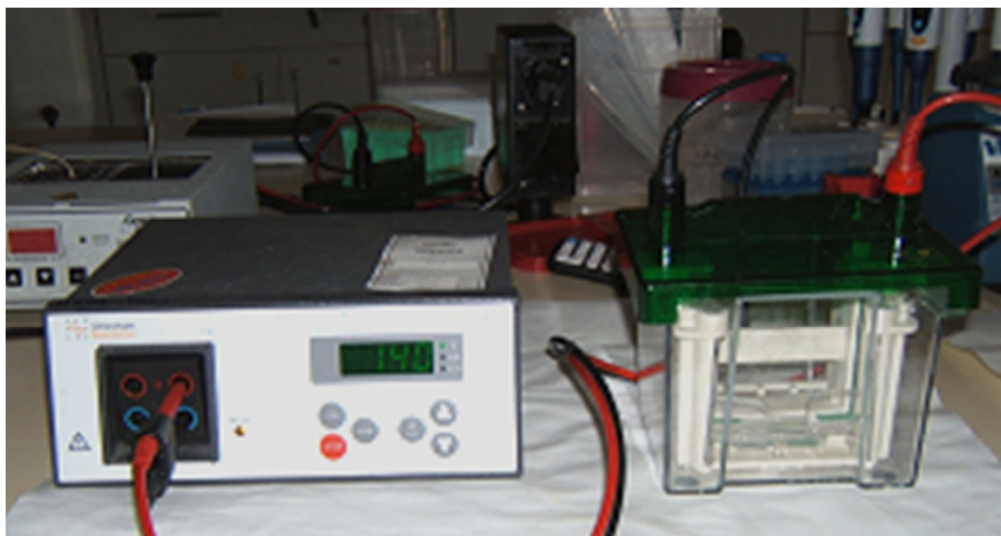


Figura 11. Cámara electroforesis vertical, Mini-Protean® Tetra Cell, BIO-RAD y Fuente de poder (Power Supply EPS 301).

2.1.3. TRANSFERENCIA PROTEICA

Las proteínas se transfirieron en un sistema semi-seco (Amersham Biosciences, TE 77) a membranas de nitrocelulosa, con un tamaño de poro de 0.45 μm , como se indica en la siguiente figura.

La transferencia se realizó, usando tampón de transferencia, a un amperaje constante de 75 mA (dos geles) durante 1.5 horas a 4°C, respetando adecuadamente la polaridad. A continuación, tras detener la transferencia, se tomaron los geles, se tiñeron con Azul de Comassie durante 2 minutos y se decoloraron con metanol al 20% - ácido acético 7% durante toda la noche con agitación constante.

Las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau durante 5 minutos, posteriormente se decoloraron con ácido acético al 5%, permitiendo esto delimitar perfectamente las calles que tenían proteína. Se lavan durante 5 minutos con agua destilada (varios baños) y PBS durante 30 minutos para eliminar completamente todos los restos de Rojo Ponceau.



Figura 12. Cubeta de transferencia conectada a fuente

2.1.4. INMUNOMARCAJE

Las membranas se sumergieron en Blotto (SIGMA) al 5% en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Se incubaron (toda la noche a temperatura ambiente y con agitación) con anticuerpo primario (ver tabla 1) diluido en solución de bloqueo diluida 1+9 en TBS.

Se lavaron tres veces con solución de lavado (5 minutos cada uno) y se incubaron con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa a una dilución 1:4000 en solución de bloqueo (diluida 1+9 en TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

Tras tres lavados de 10 minutos cada uno se reveló la actividad peroxidasa usando el kit ECL de Amershan. Se impresionó una placa de rayos X (AGFA Curix). Para el revelado de las placas se utilizó el revelador G150 y el fijador G350 de AGFA.

TAMPONES Y REACTIVOS UTILIZADOS PARA WESTERN BLOT

PBS (FOSFATE BUFFER SALINE)

KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	11.5 g
NaCl	0.8 g
Agua destilada	900 ml

El pH se ajusta a 7.4 y se enrasa a 1 litro de volumen final con agua destilada.

TBS (TRIS BUFFER SALINE)

Trizma base	6.05 g
NaCl	8.5 g
Agua destilada	700 ml

El pH se ajusta con HCl concentrado a 7.4 enrasando a 1 litro de volumen final con agua destilada.

SOLUCIÓN DE HOMOGENIZACIÓN

EDTA	2.92 mg (1 mM)
2-β-mercaptoetanol	100 mg (1%)
PMSF	1.6 mg (1 mM)
Tris 0.1 M	10 ml
NaF (Sigma)	10 mM
Ortovanadato Sódico (Sigma)	1 mM
Leupeptina	1 μg/μl
Aprotinina	1 μg/μl

SOLUCIÓN DE AZUL DE BROMOFENOL

Azúl de Bromofenol	10 mg
Etanol absoluto	1 ml

Congelar a -20°C.

TAMPÓN DE CARGA (Laemmli)

STK (4X)	2.5 ml
Solución de SDS	2 ml
Glicerol	5.5 ml
Solución de bromofenol	20 μl
2-β-mercaptoetanol	100 μl

Congelar a -20°C.

SEP

Tris	36.33 g (1.5 M)
Agua destilada	200 ml

Ajustar pH a 8.8 con HCl concentrado.

STK

Tris 6.05 g (0.5 M)

Agua destilada 100 ml

Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado.

SOLUCIÓN DE ACRILAMIDA / BIS-ACRILAMIDA

Acrilamida 7.5 g (30%)

N-N-metilenbiscrilamida 0.2 g (0.8%)

Agua destilada 25 ml

Filtrar y almacenar en oscuridad a 4°C.

SOLUCIÓN DE SDS

Dodecil sulfato sódico 1 g (20%)

Agua destilada 5 ml

SOLUCIÓN DE APS

Persulfato sódico 0.25 g (10%)

Agua destilada 1 ml

Se almacena a 4°C.

SOLUCIÓN TRIS / GLICINA (10X)

Trizma base 15.14 g (250 mM)

Glicina 72.06 g (1.92 M)

Agua destilada 500 ml

Ajustar pH a 8.3.

TAMPÓN DE ELECTROFORESIS

Solución Tris / Glicina (10X) 100 ml

Solución SDS 5 ml

Agua destilada 895 ml

TAMPÓN DE TRANSFERENCIA

NaHCO₃ 2.52 g (10 mM)

Na₂CO₃ 0.954 g (3 mM)

Metanol 600 ml

Agua destilada 2400 ml

Almacenar a 4°C.

SOLUCIÓN DE ROJO PONCEAU

Solución madre de Rojo Ponceau S al 2% en ácido tricloroacético 30% y ácido sulfosalicílico 30%. Solución usada para teñir las membranas:

Rojo Ponceau S 20 ml

Agua destilada 180 ml

SOLUCIÓN DE AZUL DE COMASSIE

Azúl de Comassie 2.5 g

Etanol absoluto 200 ml

Ácido acético glacial 50 ml (10%)

Agua destilada 250 ml

Disolver el Azul de Comassie en etanol. Filtrar y añadir el agua y el ácido acético.

ÁCIDO ACÉTICO 5%

Ácido acético 25 ml

Agua destilada 475 ml

SOLUCIÓN PARA DESTENIR

Metanol 200 ml (20%)

Ácido acético glacial 70 ml (7%)

Agua destilada 730 ml

SOLUCIÓN DE BLOQUEO

Blotto (SIGMA) 2.5 g

TBS 49.75 ml (10 mM)

Tween 20 250 µl

Almacenar a -20°C.

SOLUCIÓN DE LAVADO

Tween 20 2.5 ml (0.5%)

PBS 5X 100 ml

Agua destilada 397.5 ml

GELES DE POLIACRILAMIDA.

Véase la tabla 4:

Soluciones	Concentradora	Separadora			
% Acrilamida	3%	6%	9%	12%	15%
SEP (4X) ml	---	2.5	2.5	2.5	2.5
STK (4X) ml	1.25	---	---	---	---
Acrilamida ml	0.5	2	3	4	5
SDS μl	25	50	50	50	50
H₂O_d ml	3.2	5.4	4.4	3.4	2.4
APS μl	20	40	40	40	40
TEMED μl	10	20	20	20	20

2.2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

2.2.1. FIJACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras frescas se lavan en una solución de suero fisiológico y más tarde se fijan con formol al 10% en tampón fosfato Sörensen a pH 7.3 durante 24 horas. Tras la fijación se lavan en tampón Sörensen a pH 7.3 durante 24 horas (con cambios sucesivos).

La preparación del tampón Sörensen se realizó a partir de dos soluciones A y B: tres partes de la solución A y una parte de la solución B. Finalmente se ajusta el pH a 7.3.

Solución A	Fosfato bisódico anhidro 0.1M	14.2 g
	Agua destilada	1 L
Solucion B	Fosfato monosódico 0.1M	15.6 g
	Agua destilada	1 L

2.2.2. INCLUSIÓN EN PARAFINA

La deshidratación se hace usando alcohol etílico en concentraciones crecientes:

Alcohol 70°	1 hora
Alcohol 80°	1 hora
Alcohol 90°	1 hora
Alcohol 96°	1 hora
Alcohol 100°	1 hora
Alcohol 100°	1 hora
Butanol	24 horas (se hacen varios cambios)
Parafina I	1 hora
Parafina II	12 horas
Parafina III	3 horas



Figura 13. Moldes de parafina

Los bloques se hacen usando moldes de 2x1x1 cm (Figura 13) que se rellenan con parafina nueva fundida, se hunde la pieza en ella y se orienta adecuadamente. Los bloques se dejan a temperatura ambiente el tiempo necesario para la solidificación y enfriamiento de la parafina.

2.2.3. TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

- 1.- Se realizaron cortes de 5 μm de espesor con un micrótomos LEYCA RM 2255.
- 2.- Se recogen los cortes en un baño de agua caliente con portaobjetos previamente recubiertos con 3-aminopropyl-triethoxysilane “Silano” (SIGMA, Barcelona, España) al 3% en acetona.



Figura 14. Microtomos LEYCA RM

3.- Desparafinar e hidratar

Xileno	15 min
Xileno	15 min
Alcohol 100°	10 min
Alcohol 100°	10 min
Alcohol 96°	5 min
Alcohol 80°	5 min
Alcohol 70°	5 min
Agua destilada	5 min

4.- Teñir con Hematoxilina de Carazzi durante 5 minutos.

Hematoxilina de Carazzi

Agua destilada	400 ml
Glicerina	100 ml
Alumbre potásico en polvo	25 g
Iodato potásico	0.10 g
Hematoxilina	0.5 g

5.- Lavado en agua corriente durante 20 minutos (tiempo de viraje de la hematoxilina).

6.- Teñir con solución de eosina durante 30 segundos.

Eosina	Eosina	1 g
	Agua destilada	100 ml

7.- Lavado en agua.

8.- Deshidratar

Agua destilada	5 min
Alcohol 70°	10 seg
Alcohol 80°	10 seg
Alcohol 96°	3 min
Alcohol 100°	5 min
Alcohol 100°	5 min
Xileno	15 min
Xileno	15 min

9.- Montar con pegamento miscible con Xileno (ENTELLAN ®, Merk, Darmstadt, Alemania).

Los resultados que se pueden observar en el microscopio óptico son: núcleos color violeta y tejido conjuntivo (colágeno) aparecen de color rosa.

2.2.4. PROCESAMIENTO PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

- 1.- Se realizan cortes de 5 µm de espesor con el micrótopo.
- 2.- Se recogen los cortes en un baño de agua caliente con un portaobjetos previamente recubierto con Silano al 3% en acetona.
- 3.- Las secciones se mantienen toda la noche en una estufa a 37°C.
- 4.- Se pasan los cortes a una estufa de 60°C durante 20 minutos antes de comenzar a desparafinar las muestras.
- 5.- Desparafinar e hidratar las muestras

Xileno	15 min
Xileno	15 min
Alcohol 100°	10 min
Alcohol 100°	10 min
Alcohol 96°	5 min
Alcohol 80°	5 min
Alcohol 70°	5 min
Agua destilada	5 min

Método Peroxidasa-Antiperoxidasa

- 1.- Bloqueo de la peroxidasa endógena mediante la incubación de las secciones, desparafinadas e hidratadas, con 0.3% de H₂O₂ en agua destilada durante 20 minutos en agitación a temperatura ambiente.
- 2.- Dos lavados en tampón Tris salino (TBS) a pH 7.4 durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Se colocan los portaobjetos en un *rack* especial de plástico, se sumergen en una olla a presión convencional que contiene 2 litros de tampón citrato 0.01 M a pH 6 durante 2.5 minutos a máxima presión.
- 4.- Dejar enfriar los cortes dentro de la olla durante 20 minutos.
- 5.- Lavar las muestras 3 veces con TBS durante 5 minutos cada lavado.

6.- Bloquear la unión no específica incubando las secciones en TBS con 3% de suero de burro (NDS) y 0.05% Tritón X-100 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

7.- Eliminar el exceso de solución de bloqueo sobre los cortes, añadir el anticuerpo primario diluido (ver diluciones en tabla 1) en TBS y dejarlo toda la noche a 37°C.

8.- Lavar las muestras 3 veces con TBS durante 5 minutos cada lavado.

9.- Incubar las secciones con anticuerpo secundario correspondiente (ver tabla 2) dependiendo del origen del anticuerpo primario. La dilución se hace 1:500 en TBS y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.

10.- Lavar las muestras 3 veces con TBS durante 5 minutos cada una de ellas.

11.- Incubar las muestras con el complejo estreptavidina-biotina peroxidasa (Dako, Barcelona, Spain) diluido en TBS durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente.

12.- Lavar las muestras 3 veces con TBS durante 5 minutos cada lavado.

13.- Lavar en tampón acetato 0.1 M durante 1 minutos.

14.- Proceso de revelado usando diamino-benzidina con el método de intensificación de la enzima glucosa oxidasa. Se va controlando al microscopio óptico la reacción para detenerla con tampón acetato (todos los portas a la vez) cuando se obtenga una señal fuerte.

15.- Lavar las muestras 3 veces con TBS durante 5 minutos cada lavado.

16.- Deshidratación de las muestras

Agua destilada	5 min
Alcohol 70°	3 min
Alcohol 80°	3 min
Alcohol 96°	3 min
Alcohol 100°	5 min
Alcohol 100°	5 min
Xileno	15 min
Xileno	15 min

17.- Montar con pegamento miscible con Xileno (ENTELLAN ®).

La especificidad de la técnica se chequeó realizando una serie de controles negativos y positivos. Como control negativo para el anticuerpo primario, se incubaron secciones de cada grupo con suero preimmune en ausencia del anticuerpo primario. Como control positivo para el anticuerpo primario, se incubaron secciones de piel, amígdala y

timo (dependiendo del anticuerpo) con los mismos anticuerpos y diluciones utilizados en este estudio. Como control del anticuerpo secundario se obvió el anticuerpo primario y se incubó con el mismo tampón usado para la dilución del anticuerpo secundario.

TAMPONES PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

TBS (TRIS BUFFER SALINE)

Trizma base	6.05 g
NaCl	8.5 g
Agua destilada	700 ml

El pH se ajusta con HCl concentrado a 7.4 enrasando a 1 litro de volumen final con agua destilada.

TAMPÓN CITRATO (0.01 M)

Citrato Trisódico	29.41 g (en 1 litro de agua destilada)
Ácido Cítrico	21.01 g (en 1 litro de agua destilada)

A partir de las dos soluciones stock se mezclan 164 ml de citrato sódico + 36 ml de ácido cítrico y se enrasa a 2 litros con agua destilada. El pH final del tampón es 5.6.

TAMPÓN ACETATO

Acetato Sódico	16.4 g (en 1 litro de agua destilada)
Ácido acético	12 ml (en 1 litro de agua destilada)

A partir de las soluciones stock, se toman 226 ml de acetato sódico, 24 ml de ácido acético y se lleva hasta 500 ml con agua destilada. El tampón se queda a un pH de 6.

2.3. DENSITOMETRÍA ÓPTICA

Con el fin de poder analizar cuantitativamente el grado de expresión de las diferentes proteínas, se evaluó la densidad óptica de cada muestra. Para ello se utilizó el sistema de análisis digital de imágenes compuesto por la cámara digital “Moticam 2000” y el software informático “Motic Advanced 3000 y 3.2” (Motic China Group Co., China).



Figura 15. Microscopio óptico acoplado al sistema de análisis de imagen.

2.3.1. INMUNOHISTOQUÍMICA

Se utilizó el sistema de análisis de imagen acoplado a un microscopio óptico (Olympus Vanox-T AH-2).

Para cada anticuerpo utilizado se tomó como valor cero o “blanco” la densidad óptica del control negativo. Para cada muestra estudiada se tomaron 5 campos de visión con el objetivo 20X, tomados al azar y se midieron las respectivas densidades ópticas.

2.3.2. WESTERN BLOT

Se analizaron las densidades ópticas para cada uno de los anticuerpos y cada una de las bandas obtenidas para cada grupo de muestras. Las placas radiográficas previamente impresionadas, se convirtieron a formato electrónico mediante un escáner. Posteriormente

se tomaron las intensidades mediante el programa de análisis de imagen descrito anteriormente.

2.3.3. EVALUACIÓN Y PUNTUACIÓN DEL INMUNOMARCAJE

Para realizar la correlación y poder simplificar lo máximo posible así como trasladar su aplicación en la clínica, se realizó una valoración personal de las muestras. Primero los pacientes fueron estratificados como “positivos” (aquellos con más del 5% de la superficie teñida) o “negativos”. Para aquellas proteínas analizadas mostrando menos de un 10% de pacientes positivos se asignó a cada muestra una puntuación que integró el porcentaje de superficie teñida y la intensidad de tinción y, en concordancia, los pacientes fueron estratificados como “negativos”, “de baja”, “intermedia” o “elevada” inmunotinción.

2.3.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de todos los resultados obtenidos (inmunohistoquímica y Western blot) anteriormente por las diferentes técnicas, y también para los datos clínicos, empleamos los programas informáticos SPSS (versión 19.0 para Windows de Microsoft), Statgraphics y Prisma 3.0. En el análisis se incluyeron los marcadores inmunohistoquímicos en estudio y variables pronósticas clásicas (PSA sérico preoperatorio, estadio patológico T, estadio clínico T, puntuación Gleason, invasión perineural, metástasis en ganglios linfáticos locales, estatus de los márgenes quirúrgicos, supervivencia total y progresión bioquímica). El principal *endpoint* del estudio fue el tiempo hasta la progresión bioquímica, definido éste como el tiempo transcurrido desde la prostatectomía hasta el registro de la primera de al menos dos elevaciones consecutivas en los niveles de PSA total sérico por encima de 0.2 ng/ml.

A modo descriptivo, se proporcionó la mediana y el rango en el caso de las de variables cuantitativas, como la edad y el nivel de PSA sérico preoperatorio total, así como las frecuencias de las variables cualitativas. Las medidas de PSA, en un principio variables cuantitativas continuas, fueron transformadas en variables cualitativas utilizando como criterio de estratificación el umbral de 10 ng/ml, del cual está establecida su capacidad pronóstica (Freedland y cols., 2008). Para variables cuantitativas se usaron la t de Student y el análisis de la varianza (ANOVA) con el test de Bonferroni para el análisis de

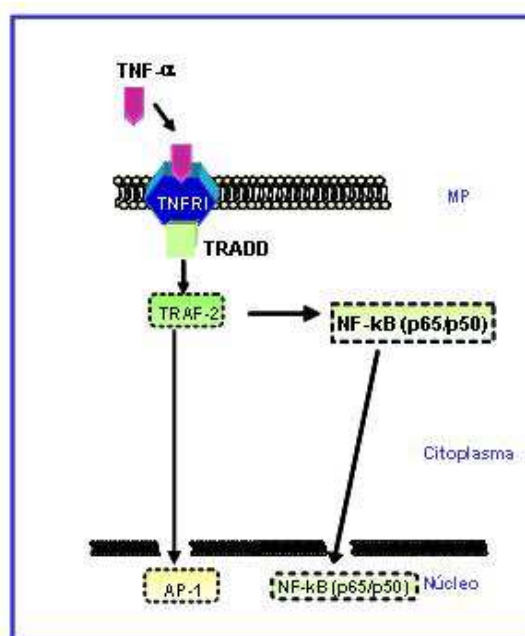
significación entre distintas variables. Para comparar variables cualitativas ordinales entre los distintos grupos se utilizó el test de Spearman.

Para el análisis de la supervivencia se realizaron curvas de Kaplan-Meier (utilizando la prueba del *log-rank* para estimar la significación) y el análisis de riesgo proporcional unifactorial de Cox. Con el objeto de evaluar la capacidad pronóstica de los marcadores en estudio en conjunción consigo mismos y/o con los marcadores pronósticos tradicionales, se utilizó el análisis de riesgo proporcional multifactorial de Cox. En ambos casos el tiempo de seguimiento de los pacientes tras la prostatectomía fue definido por la progresión bioquímica (paciente que experimenta recidiva) o la última visita (paciente censurado, que no experimenta recidiva).

En todos los análisis se consideraron valores significativos aquellos asociados a un valor de $p < 0.5$.

III. RESULTADOS

1.- ACTIVACIÓN DE TRAF-2



Activación de TRAF-2

1.1. WESTERN BLOT

Mediante Western blot se observó una única banda para TNF- α , TNFRI, TRAF-2, y actina (control positivo) en su correspondiente peso molecular (17, 55, 52 y 40 kDa respectivamente) y en cada uno de los grupos estudiados: normal (PN) y cáncer (CP) (Fig. 16).

El análisis densitométrico de las bandas para cada uno de los factores estudiados, no muestra diferencias entre PN y CP (Tabla 5).

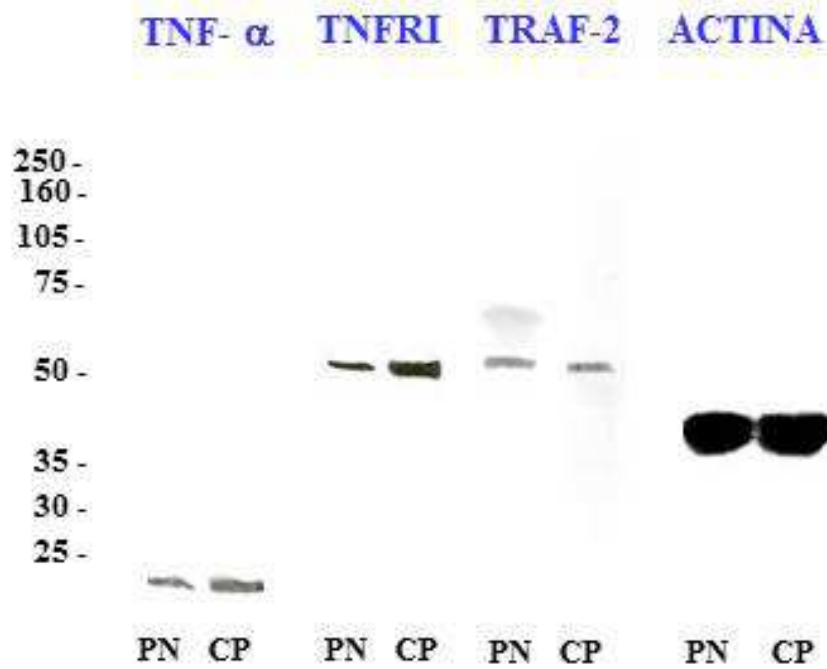


Figura 16. Western blot para TNF- α , TNFRI y TRAF-2 en próstata normal (PN) cáncer (CP).

	TNF- α	TNFRI	TRAF-2
PN	68.5 \pm 4.1 ^a	62.1 \pm 4.6 ^a	39.4 \pm 1.2 ^a
CP	73.8 \pm 5.6 ^a	70.7 \pm 6.6 ^a	36.6 \pm 2.5 ^a

Tabla 5. Análisis densitométrico de las bandas obtenidas mediante Western blot para cada anticuerpo y en cada uno de los grupos estudiados. $p < 0.001$.

1.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

TNF- α

En PN (Fig. 17A) el 80% de las muestras fueron positivas. Este factor se expresó en más del 85% de los pacientes con cáncer (Figs.17B-D). La señal siempre fue intensa y se localizó exclusivamente en el citoplasma de las células epiteliales. Cuando se compararon las densidades ópticas no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de pacientes (Tabla 6).

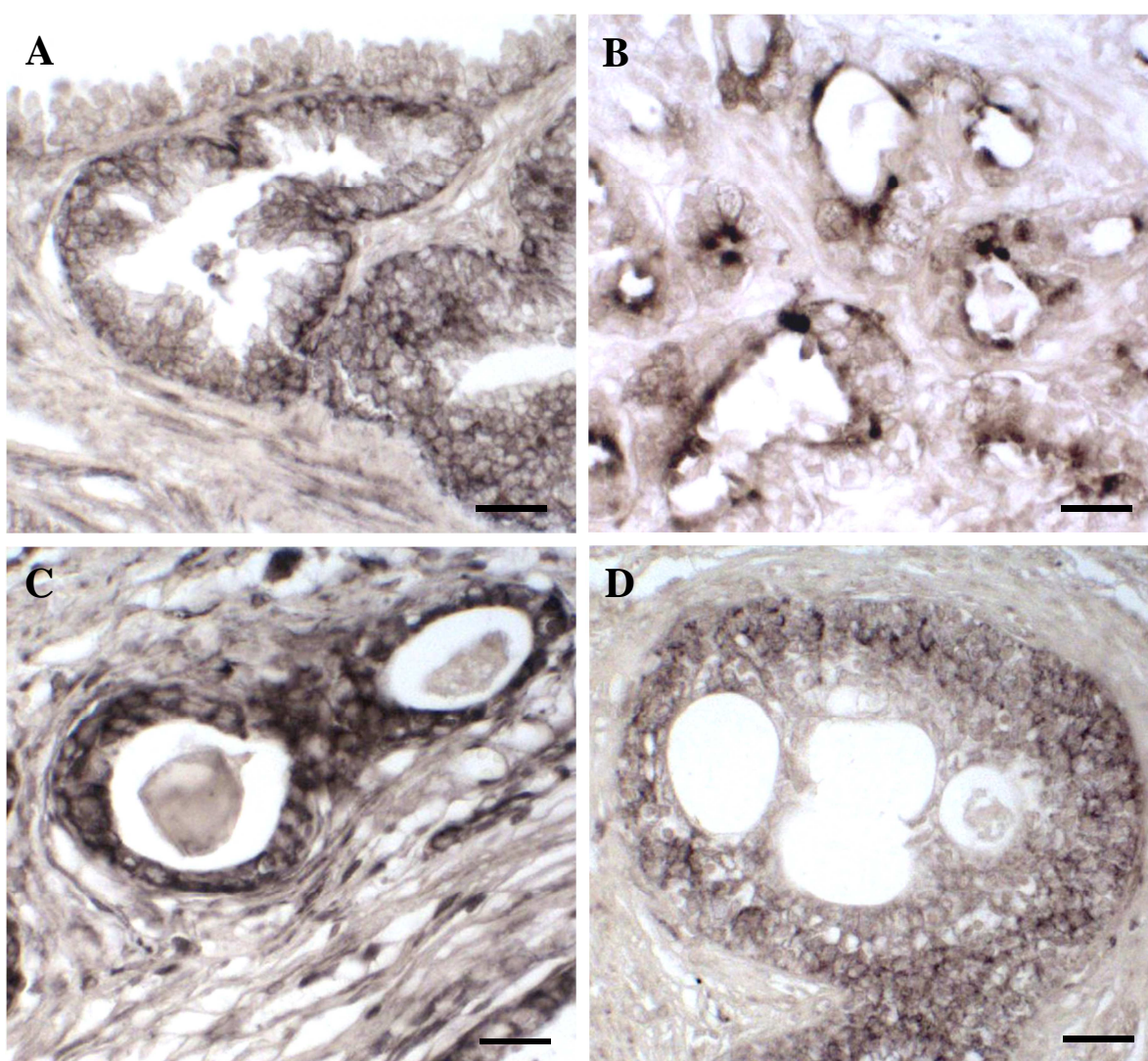


Figura 17. TNF- α localizado en el citoplasma de las células epiteliales en PN (A) y CP de bajo (B), medio (C) y alto (D) Gleason. Barra: 15 μ m (C, D) y 25 μ m (A, B).

TNFRI

Se localizó en las células epiteliales de PN y CP. En las células estromáticas apenas se observó marcaje. En cuanto a la densidad óptica, no se observaron diferencias significativas entre el grupo normal y el de los pacientes con cáncer del grupo (Figs. 18A-B).

TRAF-2

El 60% de las muestras de PN fueron positivas. Esta proteína se encontró en la zona apical de las células epiteliales. El porcentaje de muestras positivas en cáncer (Fig. 18C-D) disminuyó con la malignidad (Tabla 6).

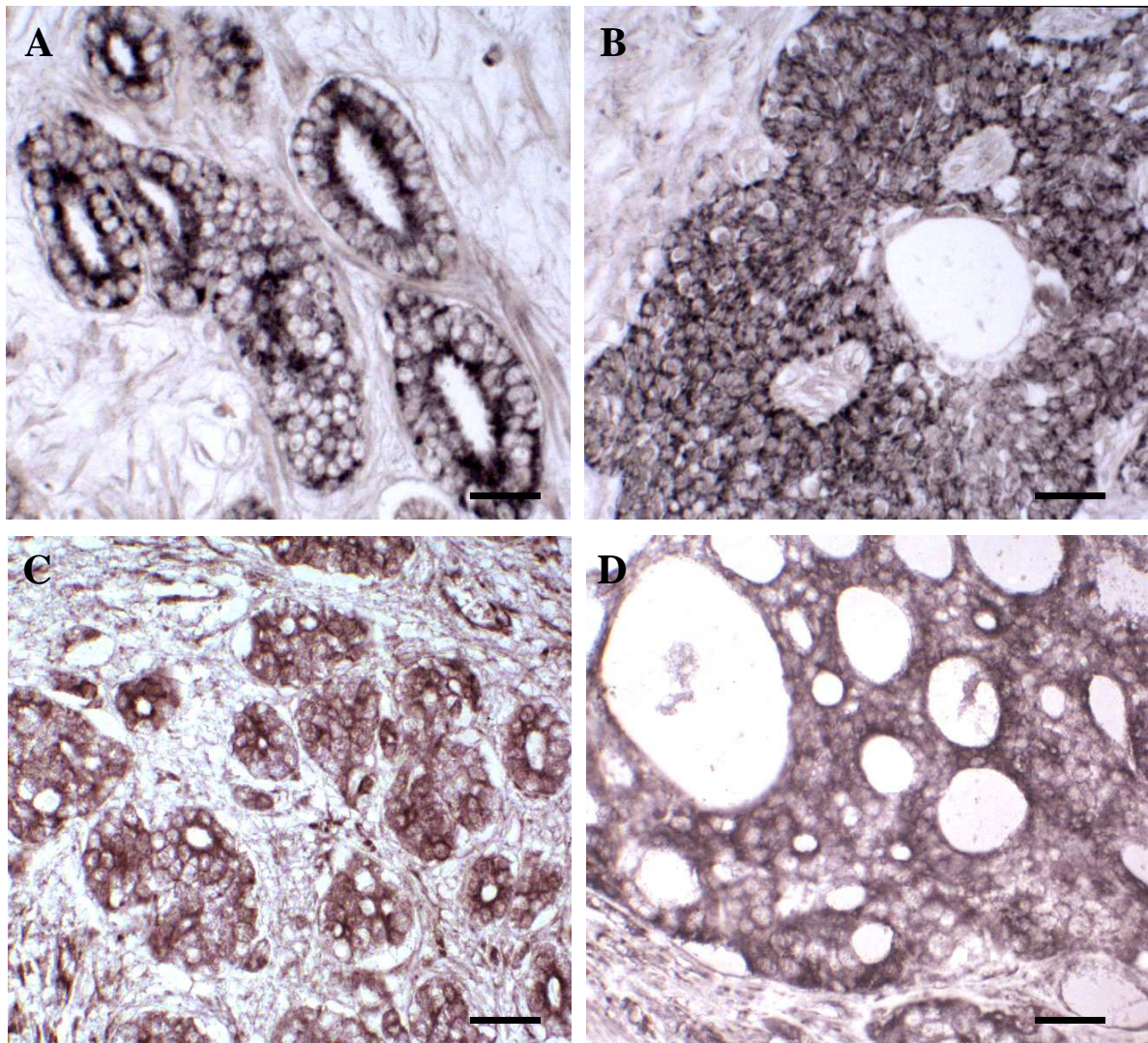
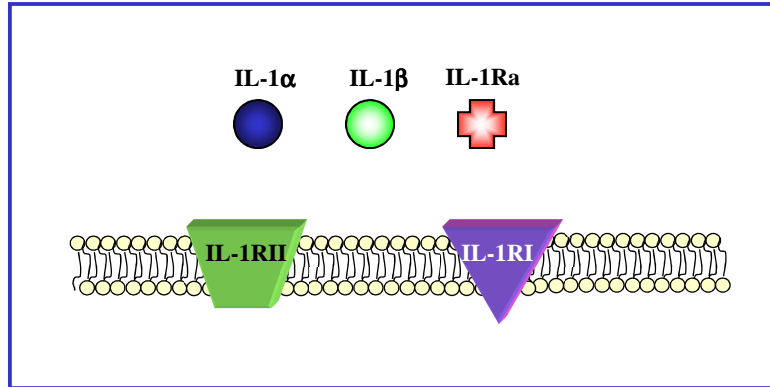


Figura 18. Inmunorreacción para TNFRI (A, B) y TRAF-2 (C, D) en el citoplasma de las células epiteliales tanto en pacientes con bajo (A, C) como alto Gleason (B, D). Barra: 10 μm (C), 15 μm (A, D) y 20 μm (B).

Muestras	TNF- α		TNFRI		TRAF-2	
	%	D.O.	%	D.O.	%	D.O.
PN (20)	80	36.30 \pm 4.5	80	16.27 \pm 4.43	60	19.08 \pm 3.68
CP\downarrowG (21)	100	31.88 \pm 4.17	85.71	22 \pm 4.54	38.09	18.74 \pm 2.87
CP\leftrightarrowG (51)	82.35	34.28 \pm 5.29	94.1	22.34 \pm 4.76	37.25	18.66 \pm 3.64
CP\uparrowG (21)	100	33.38 \pm 4.12	100	22.06 \pm 4.53	28.57	20.65 \pm 5.30

Tabla 6: Porcentaje de muestras positivas (%) y densidades ópticas (D.O.) obtenidas mediante inmunohistoquímica para TNF- α , TNFRI y TRAF-2 en cada uno de los grupos estudiados. $p < 0.001$.

2.- IL-1 Y SUS RECEPTORES



Familia de la IL-1 (IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra) y sus receptores (IL-1RI e IL-1RII).

2.1. WESTERN BLOT

Mediante Western blot se observó una única banda para IL-1 α , IL-1Ra en sus pesos moleculares correspondientes (17 y 17 kDa respectivamente) en el grupo de pacientes con cáncer (Fig. 19; Tabla 7).

IL-1 β (17 kDa) se observó en los dos grupos estudiados (PN y CP) (Fig. 19), observando mayor densidad óptica en el grupo de cáncer (Tabla 7).

En el caso de los receptores, tanto IL-1RI como IL-1RII se detectaron en su peso molecular (80 y 64 kDa respectivamente) (Fig. 20). IL-1RI se observó en los dos grupos estudiados (PN y CP) y la mayor densidad se observó en CP (Tabla 8). IL-1RII sólo se detectó en CP (Tabla 8).

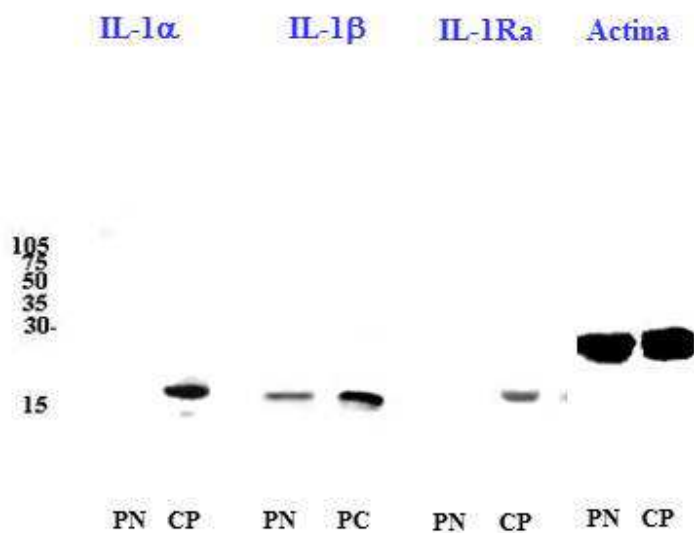


Fig. 19. Western blot para IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra en próstata normal (PN) y muestras de cáncer de próstata (CP).

	IL-1 α	IL-1 β	IL-1Ra
PN	-	9.44 \pm 1.8 ^a	-
CP	29.5 \pm 2.3 ^a	20.11 \pm 1.9 ^b	22.26 \pm 1.3 ^a

Tabla 7. Análisis densitométrico de las bandas obtenidas mediante Western blot para cada anticuerpo y en cada uno de los grupos estudiados. $p < 0.001$.

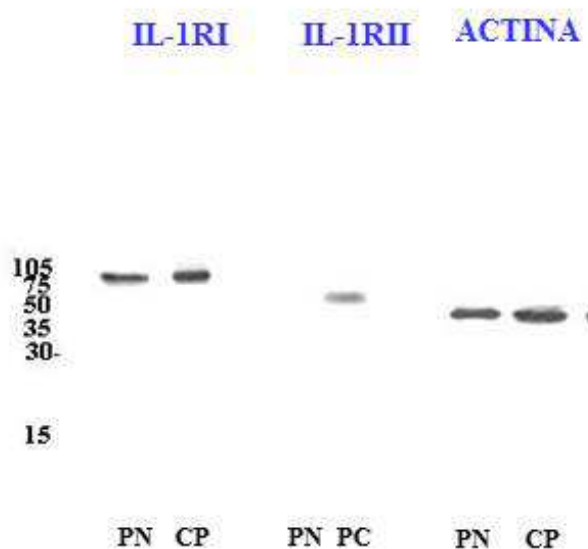


Fig. 20. Western blot para IL-1RI e IL-1RII en próstata normal (PN), muestras de cáncer de próstata (CP).

	IL-1RI	IL-1RII
PN	8.34±1.5 ^a	-
CP	16.24±2.9 ^b	19.23±4.2 ^a

Tabla 8. Análisis densitométrico de las bandas obtenidas mediante Western blot para cada anticuerpo y en cada uno de los grupos estudiados. $p < 0.001$.

2.2 IMNUNOHISTOQUÍMICA

IL-1 α

En PN se obtuvieron resultados negativos. En CP el 100%, 96.07% y 52.38% de las muestras con bajo, medio y alto grado Gleason (respectivamente) (Figs. 21A-B) mostraron IL-1 α en el citoplasma de las células epiteliales. Al medir la densidad óptica

ca no se observaron diferencias significativas entre los distintos grados Gleason en este grupo (Tabla 9).

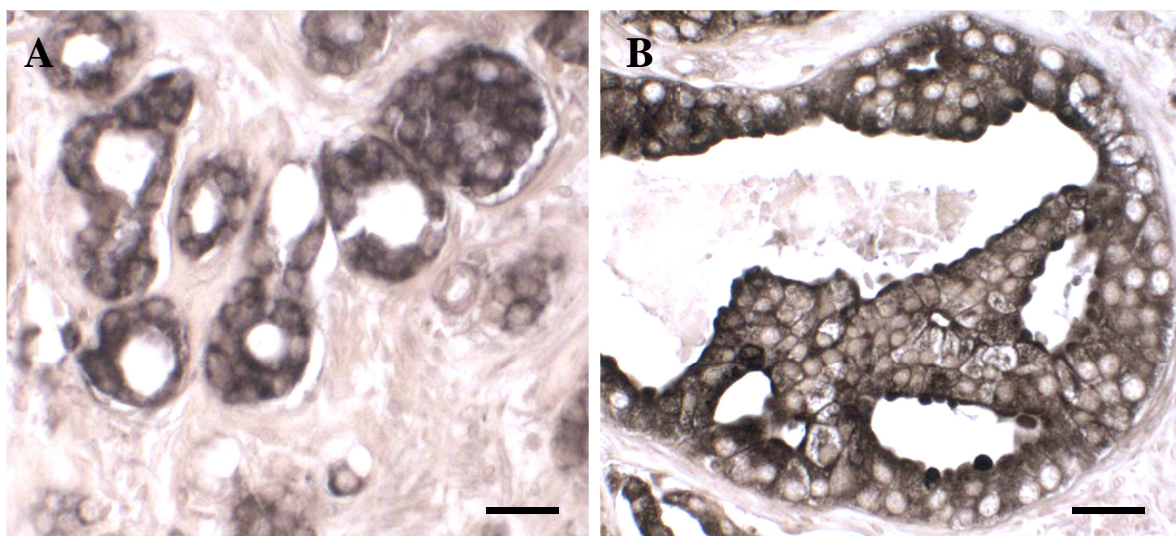


Figura 21. IL-1 α localizado en el citoplasma de las células epiteliales en CP de bajo (A) y alto (B) Gleason. Barra: 15 μ m.

IL-1B

En el 75% de las muestras normales (PN) observamos inmunorreacción citoplásmica en las células epiteliales. En muestras del grupo CP con bajo (Fig. 22A) y medio Gleason (Fig. 22B), el 47.61% y el 25.49% de las muestras presentaban un marcaje similar a PN, aunque en el grupo de bajo Gleason la densidad óptica fue significativamente mayor (Tabla 9). En tumores con alto grado Gleason la señal desapareció (Tabla 9).

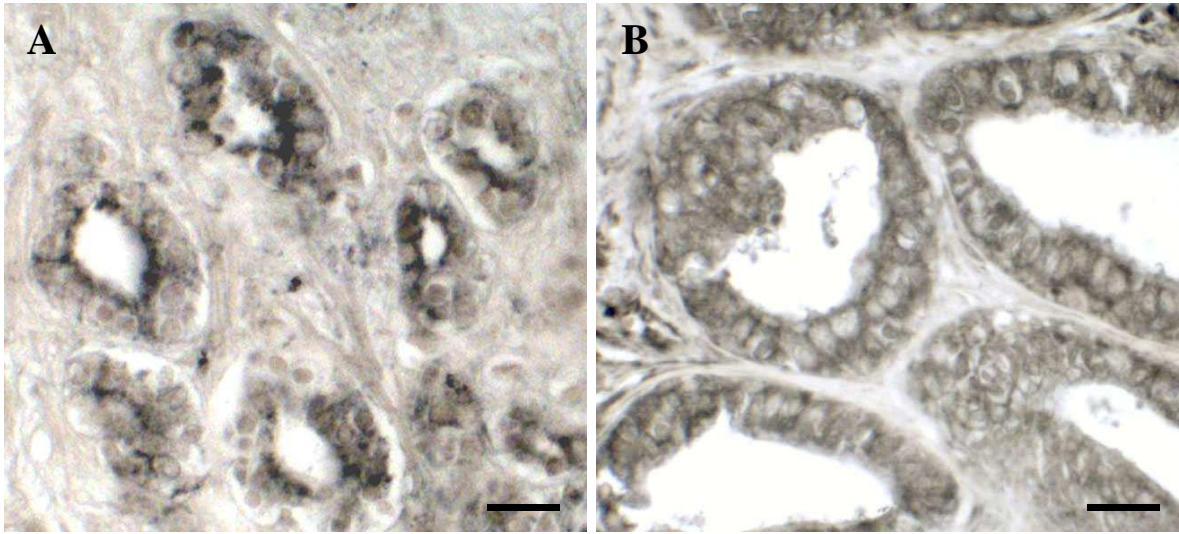


Figura 22. IL-1B en el citoplasma de las células epiteliales. En bajo Gleason (A) la densidad óptica observada fue mayor que en Gleason alto (B). Barra: 15 µm (A-B).

IL-1Ra

No se observó señal para IL-1Ra en PN (Fig. 23A) ni muestras con alto grado Gleason. En muestras con bajo y medio grado Gleason (Fig. 23B) la inmunoreacción se encontró en el citoplasma de las células epiteliales. La densidad óptica disminuyó con el grado Gleason (tabla 9).

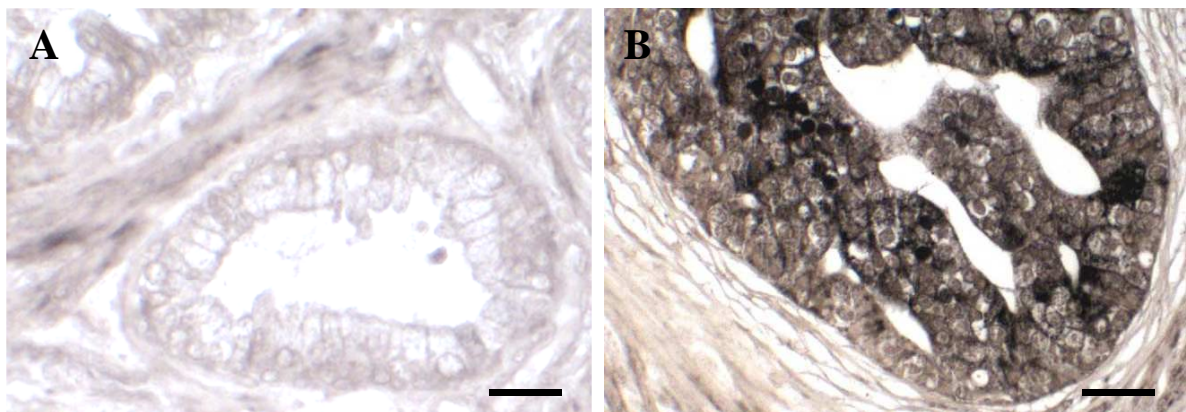


Figura 23. Aunque en PN IL-1Ra fue negativo, en CP se detectó en el citoplasma de las células epiteliales. Barra: 15 µm.

IL-1RI

Mediante inmunohistoquímica se encontró un ligero marcaje (Tabla 10) en el 100% de las muestras de PN (Fig. 24A) en el citoplasma de las células estromales. En muestras del grupo CP con bajo grado (85.71%), medio (80.3%) y alto (71.4%) grado Gleason (Fig. 24B) apareció en el citoplasma de células epiteliales y del estroma.

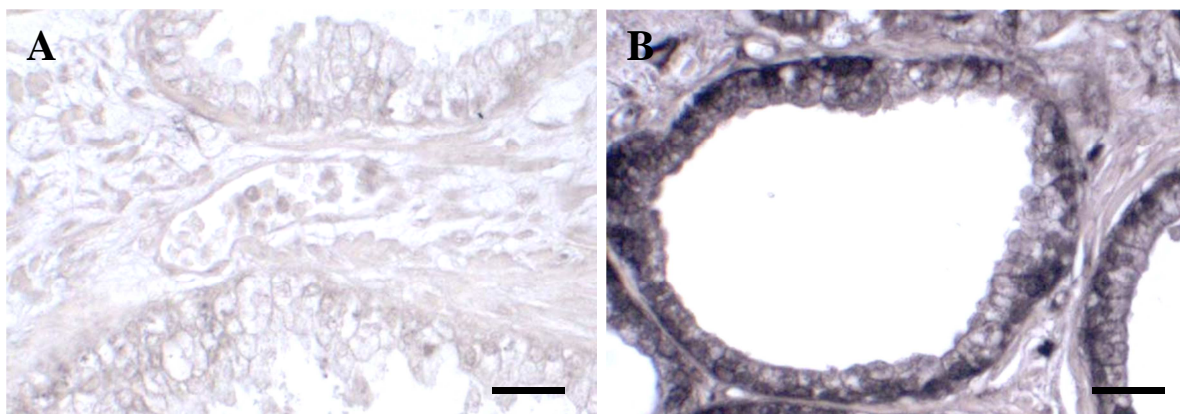


Figura 24. Control negativo para IL-1RI en PN (A). En CP (B) se detecto en el citoplasma de las células epiteliales. Barra: 20 μ m (A) y 15 μ m (B).

IL-1RII

Mediante inmunohistoquímica IL-1RII fue negativo en PN. En CP, la señal sólo apareció en la zona periférica del citoplasma de las células epiteliales. El porcentaje de muestras positivas con bajo grado Gleason (57.14%) (Fig. 25A) fue muy similar al encontrado en muestras con medio (70.5%) y alto grado Gleason (66.4%). La densidad óptica fue significativamente mayor en bajo que en medio (Fig. 25B) y alto Gleason (sin diferencias entre estos dos grupos) (Tabla 10).

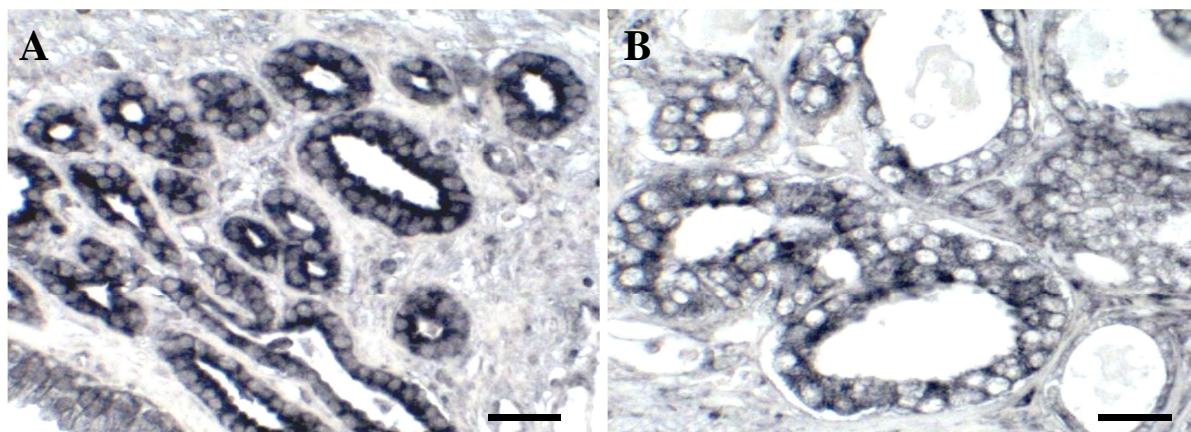


Figura 25. En CP, la densidad óptica para IL-1RII en bajo Gleason (A) fue mayor que la observada en medio (B) y alto Gleason. Barra: 25 μ m.

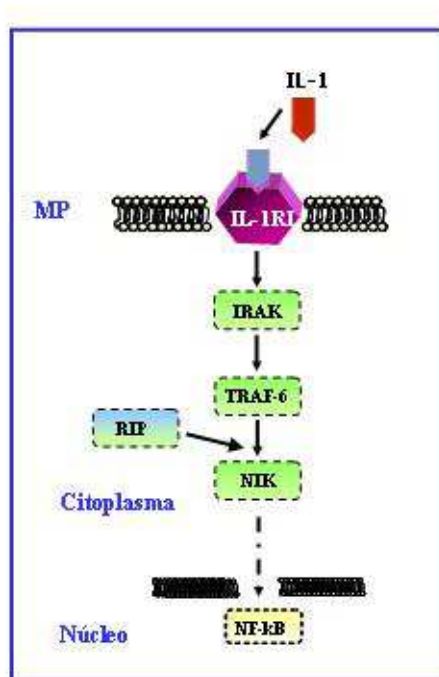
Muestras	IL-1 α		IL-1B		IL-1Ra	
	%	D.O.	%	D.O.	%	D.O.
PN (20)	0	---	75	32.58 \pm 1.59 ^a	0	---
CP \downarrow G (21)	100	39.22 \pm 2.45 ^a	47.61	39.6 \pm 2.84 ^b	47.61	26.04 \pm 2.81 ^a
CP \leftrightarrow G (51)	96.07	40.75 \pm 1.83 ^a	25.49	31.02 \pm 1.94 ^a	35.29	20.13 \pm 2.84 ^b
CP \uparrow G (21)	52.38	40.93 \pm 2.68 ^a	0	---	0	---

Tabla 9. Porcentaje de muestras positivas (%) y densidades ópticas (D.O.) obtenidas mediante inmunohistoquímica para IL-1 α , IL-1B e IL-1Ra en todos los grupos estudiados. $p < 0.001$.

Muestras	IL-1RI		IL-1RII	
	%	D.O.	%	D.O.
PN (20) Epitelio Estroma	---	---	---	---
CP \downarrow G (21) Epitelio Estroma	85.71	37.88 \pm 1.71 [¥] 42.69 \pm 1.81 ^b	57.14	43.42 \pm 2.21 ^a
CP \leftrightarrow G (51) Epitelio Estroma	80.3	36.34 \pm 1.61 [¥] 39.3 \pm 1.99 ^b	70.5	36.22 \pm 1.73 ^b
CP \uparrow G (21) Epitelio Estroma	71.42	36.65 \pm 1.66 [¥] 35.52 \pm 2.4 ^c	66.6	35.52 \pm 3.65 ^b

Tabla 10. Porcentaje de muestras positivas (%) y densidades ópticas (D.O.) obtenidas mediante inmunohistoquímica para IL-1RI e IL-1RII en todos los grupos estudiados. $p < 0.001$.

3.- ACTIVACIÓN DE NIK



Activación de NIK

3.1. WESTERN BLOT

IRAK y TRAF-6 se detectaron en su correspondiente peso molecular (70 y 60 kDa respectivamente) en los dos grupos estudiados (Fig. 26). En ambos casos, la mayor densidad se observó en CP (Tabla 11).

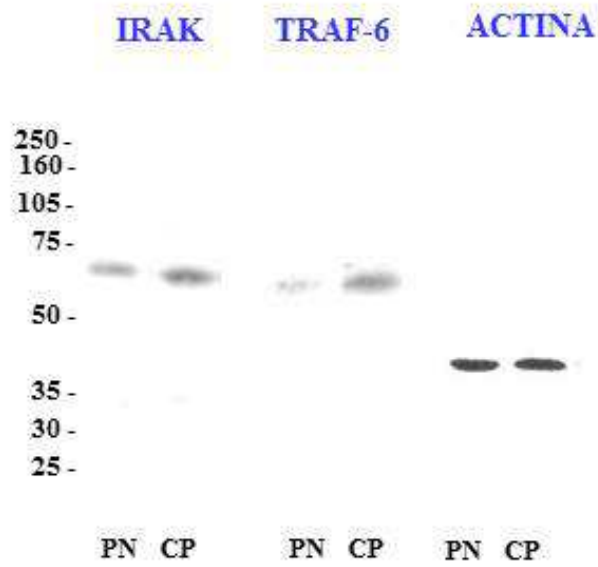


Fig. 26. Western blot para IRAK y TRAF-6 en próstata normal (PN) y muestras de cáncer de próstata (CP).

	IRAK	TRAF-6
PN	12.5±4.1 ^a	9±1.5 ^a
CP	36.4±3.9 ^b	27.5±3.8 ^b

Tabla 11. Análisis densitométrico de las bandas obtenidas mediante Western blot para cada anticuerpo y en cada uno de los grupos estudiados. $p < 0.001$.

3.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

IRAK

En la gran mayoría de las muestras de PN (Fig. 27A) y cáncer (Figs. 27B-C) se detectó en el citoplasma de las células epiteliales. En cuanto a la densidad óptica, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos estudiados (Tabla 12).

TRAF-6

En el 80% de las muestras de PN (Fig. 27D), TRAF-6 se localizó en las células epiteliales. En CP aumentó ligeramente el número de pacientes positivos (más del 90%) y se localizó también en células epiteliales. La densidad óptica fue significativamente mayor en los pacientes de CP (Figs. 27E-F), sin observar diferencias entre los distintos grupos estudiados (Tabla 12).

Muestras	IRAK		TRAF-6	
	%	D.O.	%	D.O.
PN (20)	100	13.39±3.93	80	7.72±2.12 ^a
CP ↓G (21)	100	20.77±4.01	95.23	21.1±2.98 ^b
CP ↔G (51)	100	18.65±5.76	92.15	20.47±2.08 ^b
CP ↑G (21)	100	21.52±4.45	95.23	21.76±3.09 ^b

Tabla 12. Porcentaje de muestras positivas (%) y densidades ópticas (D.O.) obtenidas mediante inmunohistoquímica para IRAK y TRAF-6 en cada uno de los grupos estudiados. $p < 0.001$.

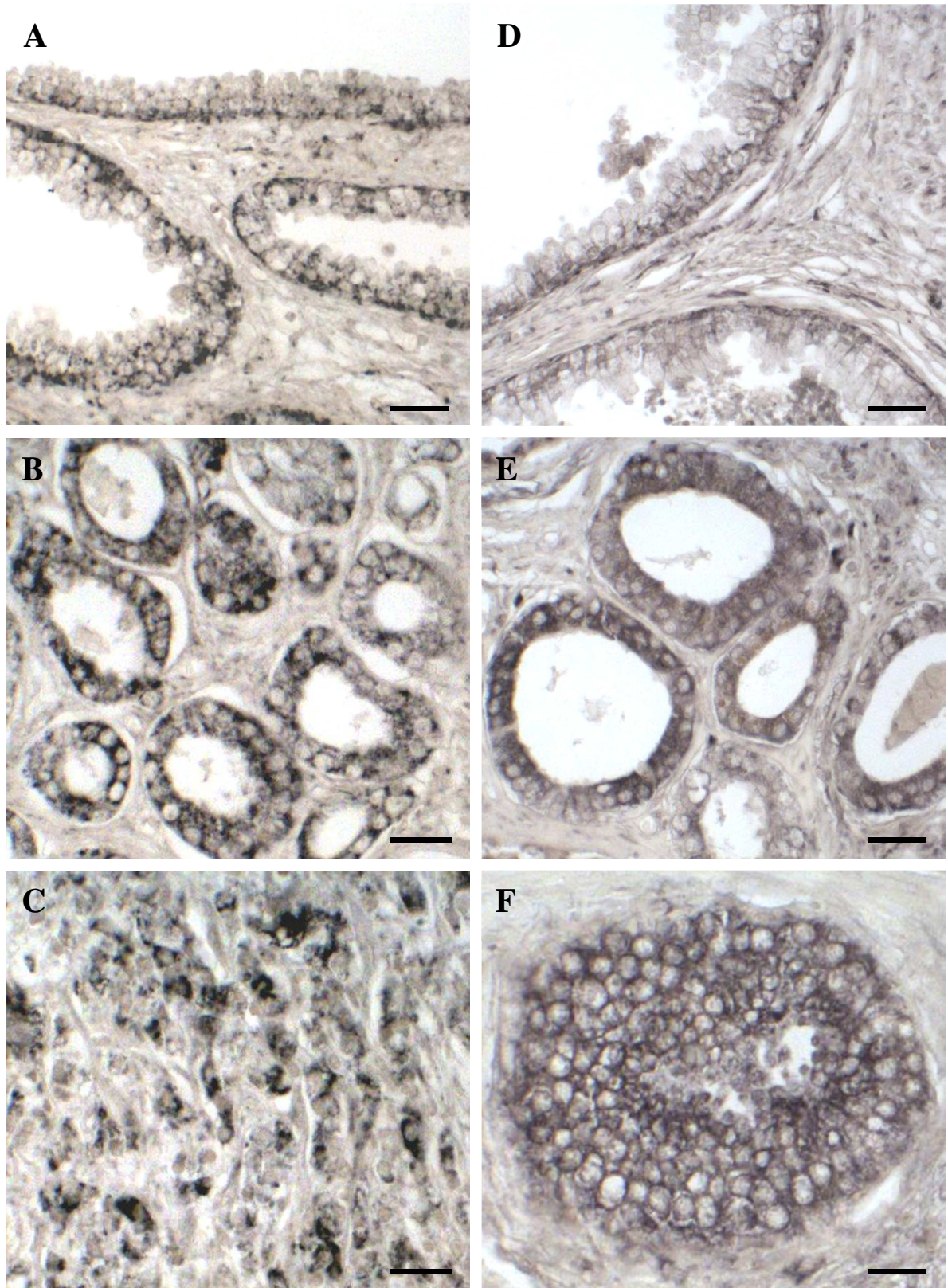
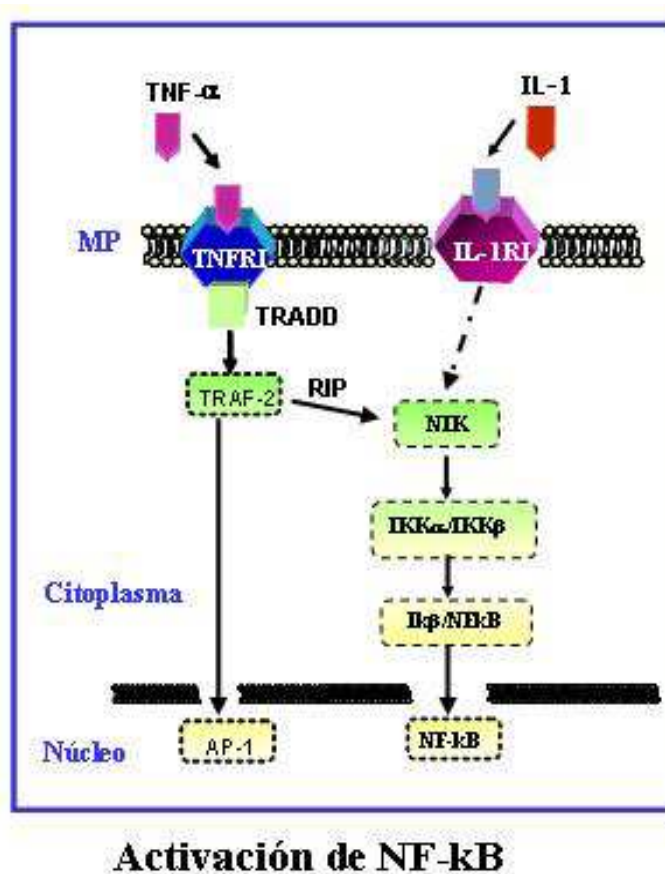


Figura 27. IRAK (A-C) y TRAF-6 (D-F) siempre se localizaron en el citoplasma de las células epiteliales en PN (A, D) y CP (B-C, E-F). En CP, no se encontraron diferencias significativas entre bajo, medio (B, E) y alto (C, F) grado Gleason. Barra: 25 μ m (A, C, D), 20 μ m (B, E) y 15 μ m (F).

4.- RUTA DE TRANSDUCCIÓN DE NIK/NF-KB



4.1. WESTERN BLOT

Mediante Western blot se observó una única banda para RIP y NIK en su correspondiente peso molecular (130 y 74 kDa respectivamente) en cáncer (Fig. 28). En PN sólo se observó señal para NIK (Fig. 28).

NIK se detectó en los dos grupos estudiados, siendo mayor la señal en cáncer que en PN (Tabla 13).

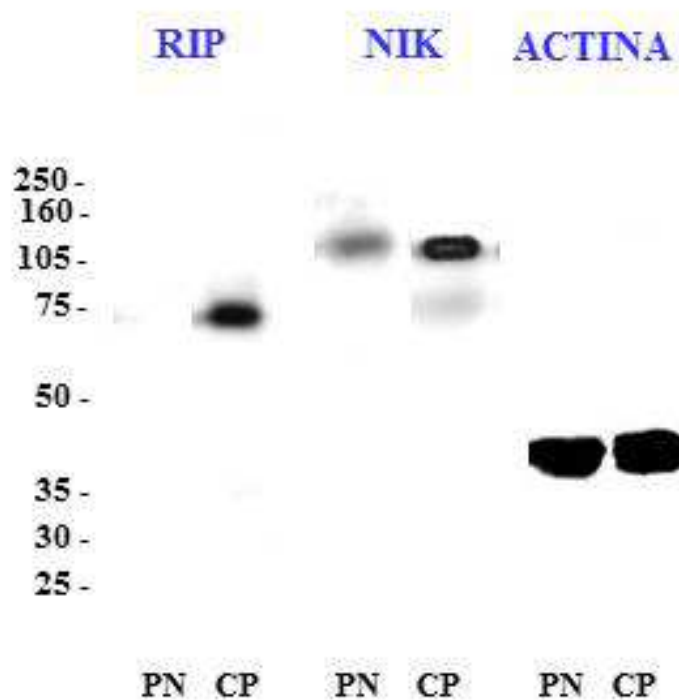


Figura 28. Western blot para RIP y NIK en próstata normal (PN), muestras de cáncer de próstata (CP).

	RIP	NIK
PN	3.5±1.1 ^a	57.1±6.9 ^a
CP	52.8±2.8 ^b	85.2±2.1 ^b

Tabla 13. Análisis densitométrico de las bandas obtenidas mediante Western blot para cada anticuerpo y en cada uno de los grupos estudiados. $p < 0.001$.

4.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

RIP

El 100% de las muestras de PN fueron negativas. RIP siempre se localizó en el citoplasma de las células secretoras. La mayor densidad óptica se observó en los pacientes de Gleason bajo (Fig. 29A) y medio (Fig. 29B), mientras que descendió significativamente en los pacientes de Gleason alto (Fig. 29C, Tabla 14).

Muestras	RIP		NIK	
	%	D.O.	%	D.O.
PN (20)	0	0	100	21.47±1.78 ^a
CP ↓G (21)	66.6	23.34±4.65 ^a	66.66	30.96±2.41 ^b
CP ↔G (51)	39.21	18.05±3.65 ^b	96.07	36.39±5.21 ^b
CP ↑G (21)	57.14	9.91±1.43 ^c	100	36.20±3.99 ^b

Tabla 14: Porcentaje de muestras positivas (%) y densidades ópticas (D.O.) obtenidas mediante inmunohistoquímica para RIP y NIK en cada uno de los grupos estudiados. $p < 0.001$.

NIK

En todas las muestras normales (Fig. 29D) la señal se encontró en el citoplasma de las células secretora. En cáncer, el porcentaje de pacientes positivos fue superior al 80% (Tabla 14). En cáncer (Figs. 29E-F), la densidad óptica fue mayor (estadísticamente significativa) respecto al grupo de los pacientes normales y además, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grados Gleason (Tabla 14).

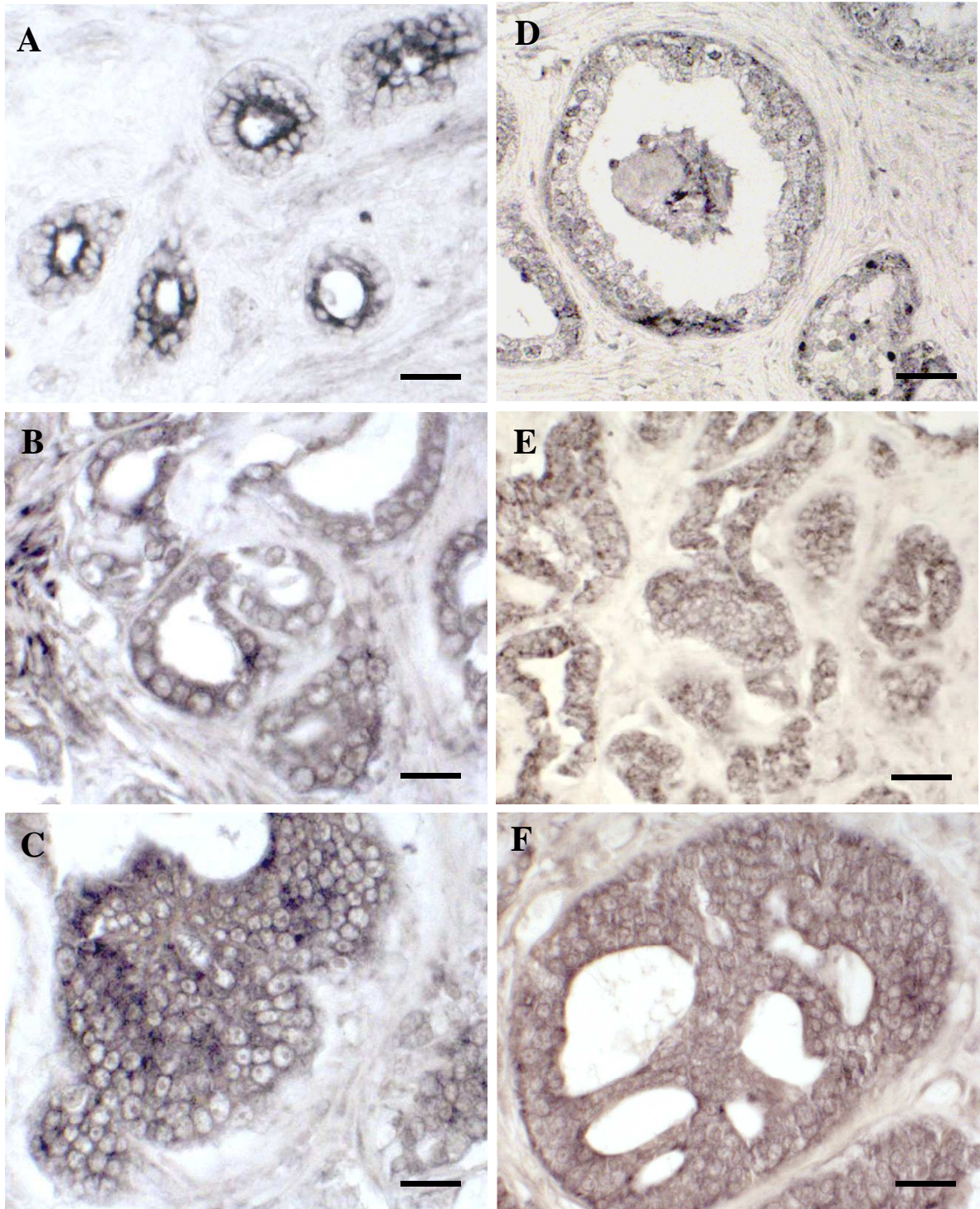
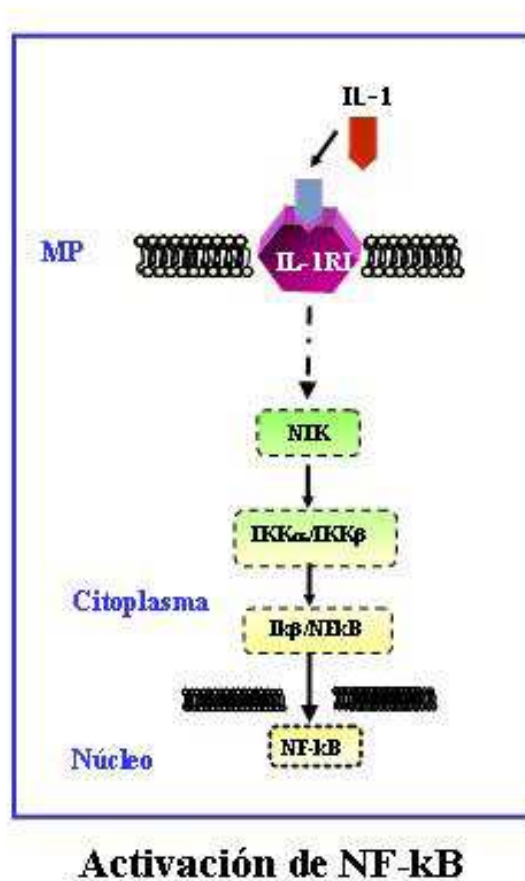


Figura 29. RIP se localizó mediante inmunohistoquímica en el citoplasma de las células secretoras. En cáncer (A-C), la densidad óptica fue significativamente mayor en los pacientes de bajo (A) y medio (B) Gleason (sin diferencias entre ambos) que en los pacientes de alto Gleason (C). En PN (D), NIK se localizó en el citoplasma de las células secretoras. En el cáncer (E-F), la densidad óptica fue significativamente mayor que en PN. En este grupo, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grados Gleason. Barra: 15 μ m (A-C), 20 μ m (F) y 30 μ m (D-E).

5.- ACTIVACIÓN DE NF- κ B



5.1. WESTERN BLOT

Mediante Western blot se observó una única banda para p-Ikk, Ikk, p-IkB e IkB en su correspondiente peso molecular (85, 85, 37 y 37 kDa respectivamente) tanto en PN como en cáncer (Fig. 30).

La densidad óptica para Ikk, p-IkB e IkB fue mayor en CP que en PN (Tabla 15). No se observaron diferencias significativas para p-Ikk.

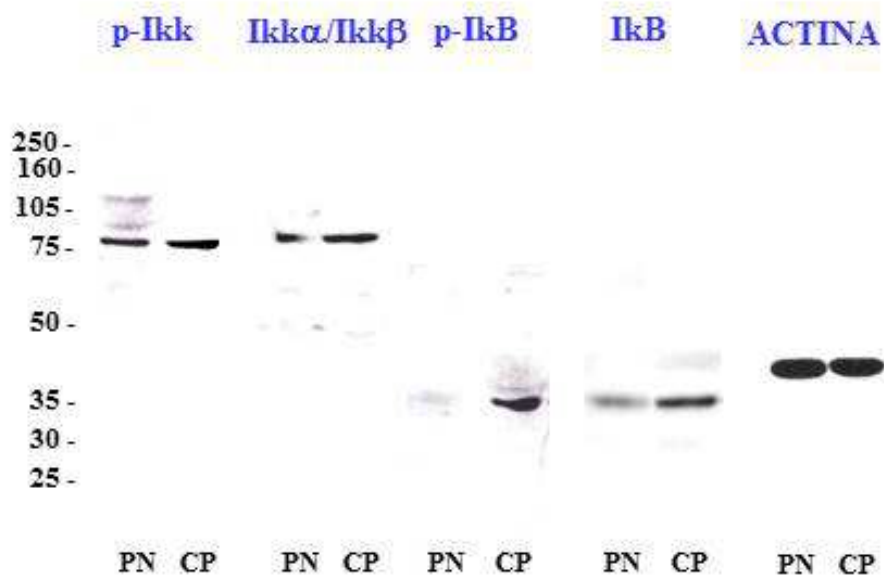


Figura 30. Western blot para p-Ikk, Ikk, p-IkB e IkB en próstata normal (PN) y cáncer de próstata (CP).

	p-Ikk	Ikk	p-IkB	IkB
PN	18.5±2.1 ^a	22.5±1.1 ^a	9.1±2.5 ^a	10.1±2.4 ^a
CP	23.8±4.8 ^a	47.8±2.8 ^b	45.2±3.1 ^b	39.4±1.9 ^b

Tabla 15. Análisis densitométrico de las bandas obtenidas mediante Western blot para cada anticuerpo y en cada uno de los grupos estudiados. $p < 0.001$.

5.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

p-Ikk

En PN sólo se observó en el 25% de los pacientes estudiados, mientras que en cáncer, se observó en más del 47% de los pacientes. Sin embargo, al estudiar la densidad óptica, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos (Figs. 31A-B, Tabla 16).

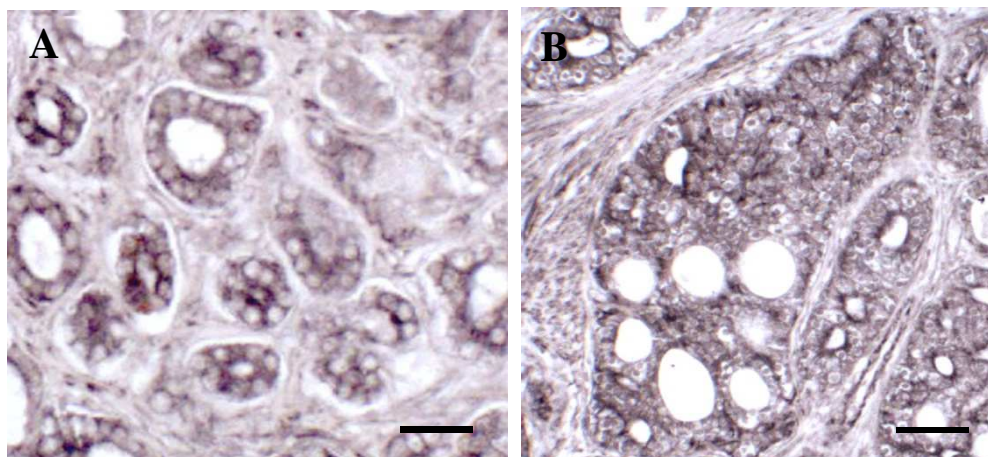


Figura 31. p-Ikk se detectó en el citoplasma de las células epiteliales tanto en bajo (A) como en alto (C) Gleason. Barra: 20 µm.

Ikk

En el 80% de los pacientes con PN se observó en el citoplasma de las células epiteliales. La densidad óptica, fue mayor en cáncer que en PN (Tabla 16). En CP (Figs. 32A-B), disminuyó el número de pacientes positivos, pero no se observaron diferencias significativas entre los distintos grados Gleason (Tabla 16).

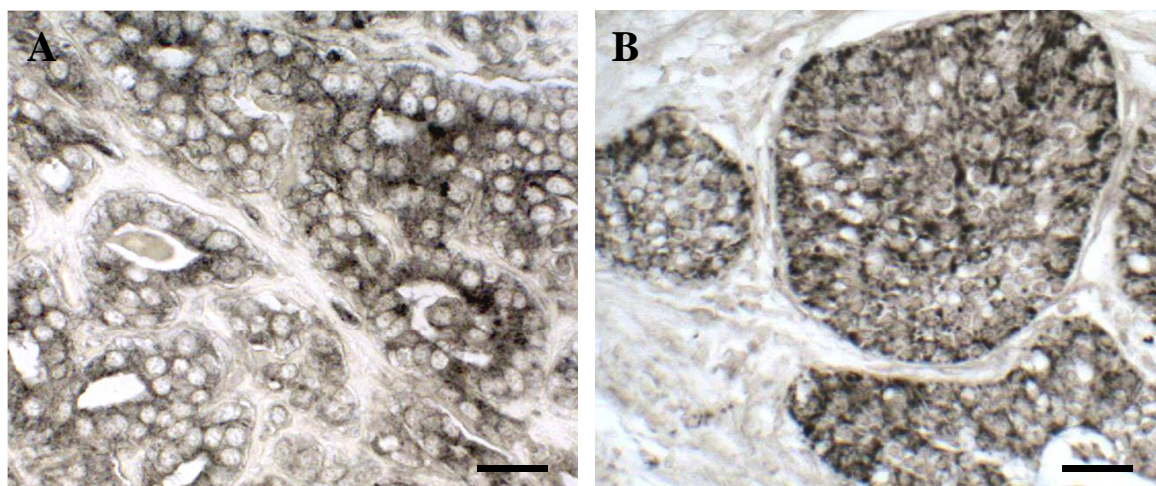


Figura 32. IKK se detectó en el citoplasma de las células epiteliales tanto en medio (A) como en alto (C) Gleason. Barra: 20 µm.

Muestras	Ikk		p-Ikk	
	%	D.O.	%	D.O.
PN (20)	80	10.29±1.31 ^a	25	9.4±2.0
CP ↓G (21)	66.6	21.69±2.18 ^b	47.6	11.4±0.8
CP ↔G (51)	62.74	17.43±2.34 ^b	49.01	13.2±1.3
CP ↑G (21)	85.71	18.24±2.81 ^b	66.66	12.3±2.75

Tabla 16. Porcentaje de muestras positivas (%) y densidades ópticas (D.O.) obtenidas mediante inmunohistoquímica para Ikk y p-Ikk en cada uno de los grupos estudiados. $p < 0.001$.

p-IkB

Se observó en el citoplasma del 40% de PN. El porcentaje de pacientes positivos aumento por encima del 70% en el grupo de Cáncer (Figs. 33A-B). Aunque el aumento de la densidad óptica fue estadísticamente significativo en el grupo de CP respecto a PN, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grados Gleason (Tabla 17).

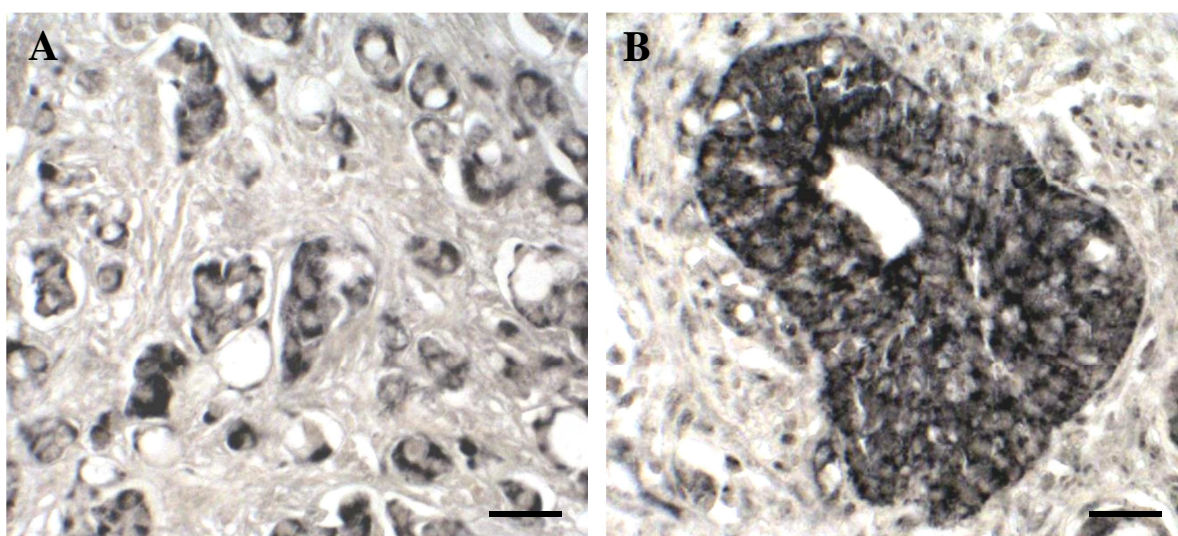


Figura 33. p-IkB se detectó en el citoplasma de las células epiteliales en todos los pacientes con cáncer, sin observar diferencias significativas entre los diferentes grados Gleason. Barra: 20 μ m.

IκB

En el 60% de los pacientes con PN (Fig. 34A) se observó escasa señal en el citoplasma de las células epiteliales (Tabla 17). La señal aumentó considerablemente (estadísticamente significativo) en más del 75% de los pacientes pertenecientes al grupo cáncer, sin encontrar variaciones significativas entre bajo (Fig. 34B), medio (Fig. 34C) y alto (Fig. 33D) grado Gleason (Tabla 17).

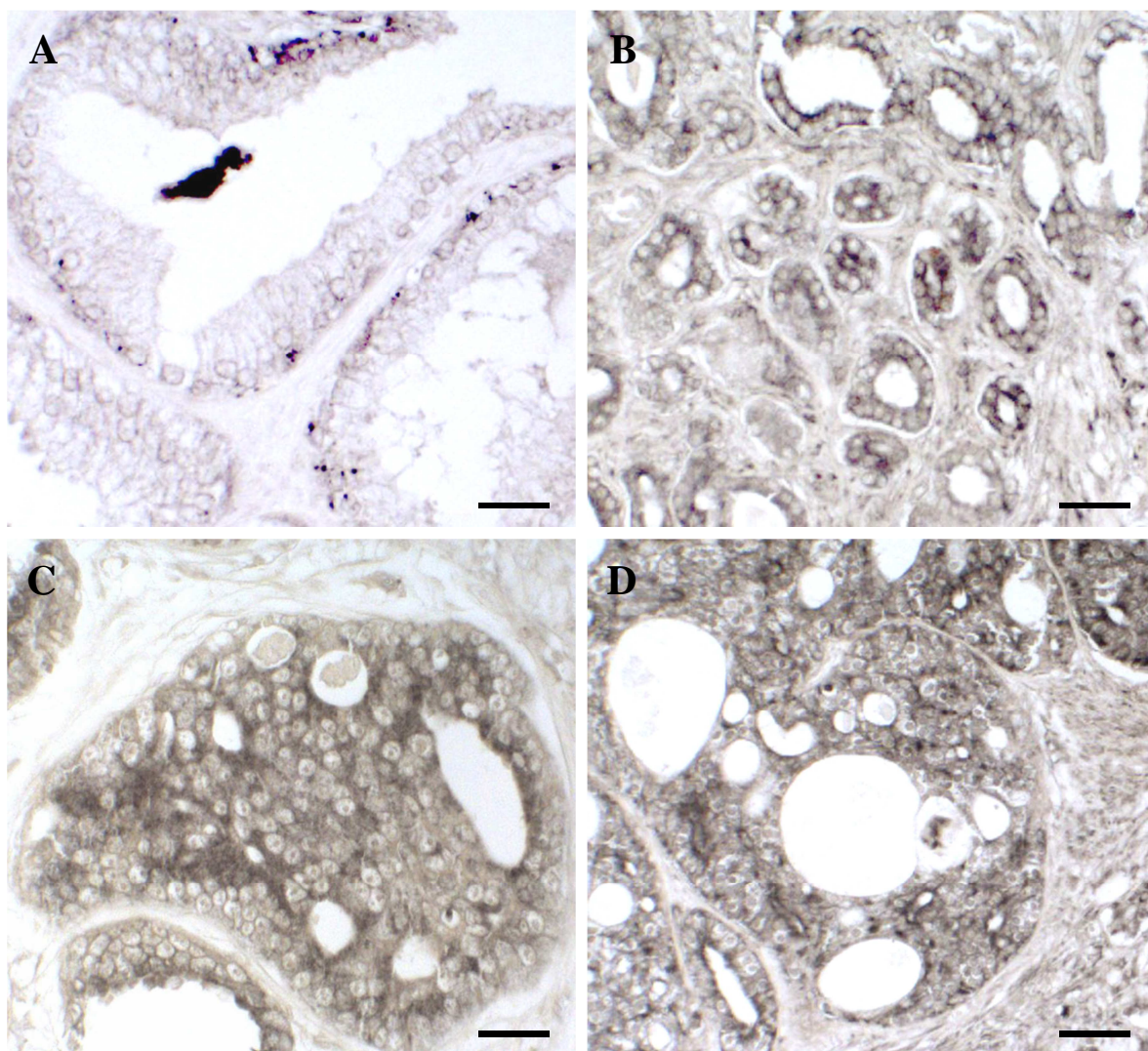
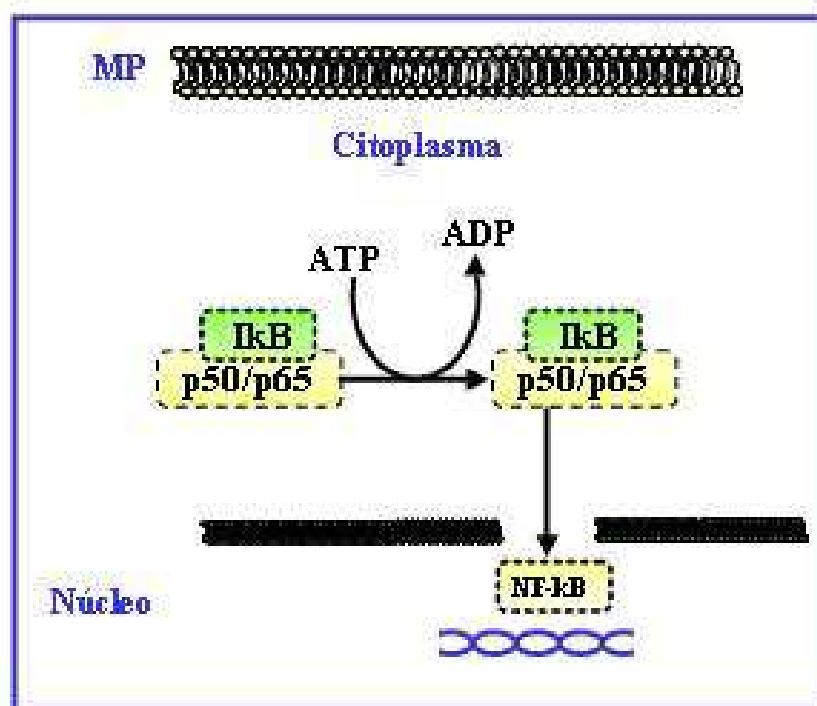


Figura 34. En PN (A), IκB se localizó mediante inmunohistoquímica en el citoplasma de las células epiteliales. En cáncer (B-D), la densidad óptica fue significativamente mayor que en PN. En este grupo, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grados Gleason. Barra: 20 μm (A-B) y 25 μm (C-D).

Muestras	IkB		p-IkB	
	%	D.O.	%	D.O.
PN (20)	60	8.71±1.88	40	8.88±2.34 ^a
CP ↓G (21)	80.9	27.83±4.60	66.6	21.75±2.25 ^b
CP ↔G (51)	76.47	26.52±3.68	78.43	21.18±2.10 ^b
CP ↑G (21)	66.6	26.21±3.86	85.71	23.77±2.36 ^b

Tabla 17. Porcentaje de muestras positivas (%) y densidades ópticas (D.O.) obtenidas mediante inmunohistoquímica para IkB y p-IkB en cada uno de los grupos estudiados. $p < 0.001$.

6.- NF-kB



NF-κB

6.1. WESTERN BLOT

Mediante Western blot se observó una única banda para p50 y p65 en su correspondiente peso molecular (50 y 65 respectivamente) y en los pacientes con cáncer (Fig. 345). En próstata normal, sólo se encontró señal para p50 (Fig. 34).

La densidad óptica de p50 fue mayor en CP que en PN (Tabla 18).

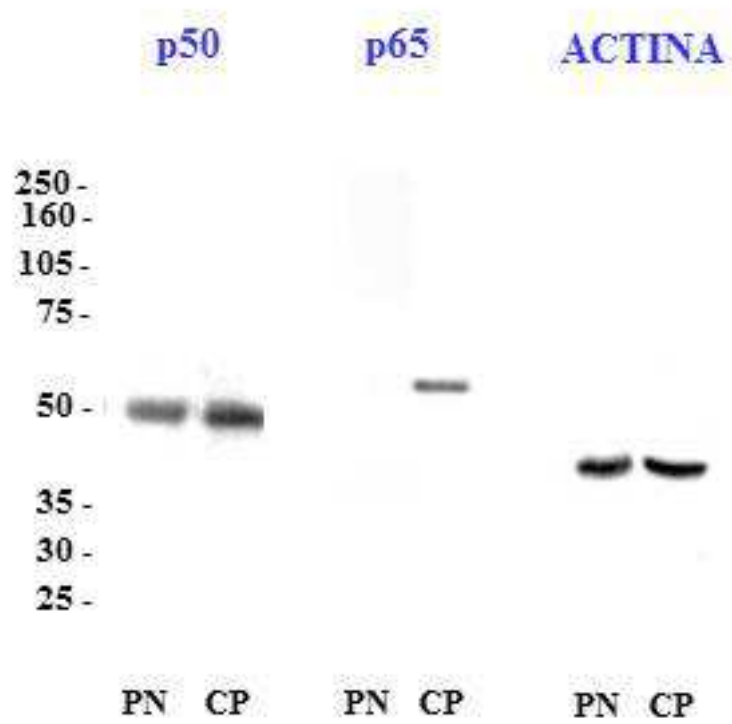


Figura 35: Western blot para p50 y p65 en próstata normal (PN), y muestras de cáncer de próstata (CP).

	p50	p65
PN	19.53±3.51 ^a	---
CP	42.86±3.38 ^b	25.53±5.1 ^a

Tabla 18. Análisis densitométrico de las bandas obtenidas mediante Western blot para cada anticuerpo y en cada uno de los grupos estudiados. $p < 0.001$.

6.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

NF-kB (p50)

En el caso de los pacientes normales p50 apareció en el 60% de las muestras con escasa señal en el citoplasma de las células epiteliales y estromáticas (Fig. 36A). En cáncer se encontró, en el 100% de los pacientes, tanto en el citoplasma como en el núcleo. La densidad óptica de p50 fue mayor en cáncer que en PN. Al comparar los diferentes grados Gleason, no se observaron variaciones entre bajo y medio (Fig. 36B), mientras que fue significativamente mayor en los pacientes de alto Gleason (Fig. 36C) (Tabla 19).

NF-kB (p65)

No se obtuvo señal para p65 en PN (Fig. 35D). El 100% de las muestras de cáncer con bajo grado Gleason fueron positivas, de éstas el 19% presentó localización nuclear. La densidad óptica aumento con el grado Gleason (Figs. 35E-F, Tabla 19).

Muestras	NF-kB (p50)		NF-kB (p65)	
	%	D.O.	%	D.O.
PN (20)	60	7.22 ± 1.8 ^a	-	-
CP ↓G (21)				
Citoplasma	80.9	28.01±2.25 ^b	100	23.8±2.93 ^a
Núcleo	30.1	32.08±2.96 [¥]	19	28.34±2.04 [¥]
CP ↔G (51)				
Citoplasma	94.1	29.17±1.22 ^b	92.1	29.09±1.90 ^b
Núcleo	41.2	33.82±4.07 [¥]	45.1	34.91±4.32 [¥]
CP ↑G (21)				
Citoplasma	100	39.37±4.15 ^c	80.9	36.71±2.18 ^b
Núcleo	47.6	41.26±2.31 [§]	71.4	47.56±1.20 [§]

Tabla 19. Porcentaje de muestras positivas (%) y densidades ópticas (D.O.) obtenidas mediante inmunohistoquímica para p50 y p65 en cada uno de los grupos estudiados. $p < 0.001$.

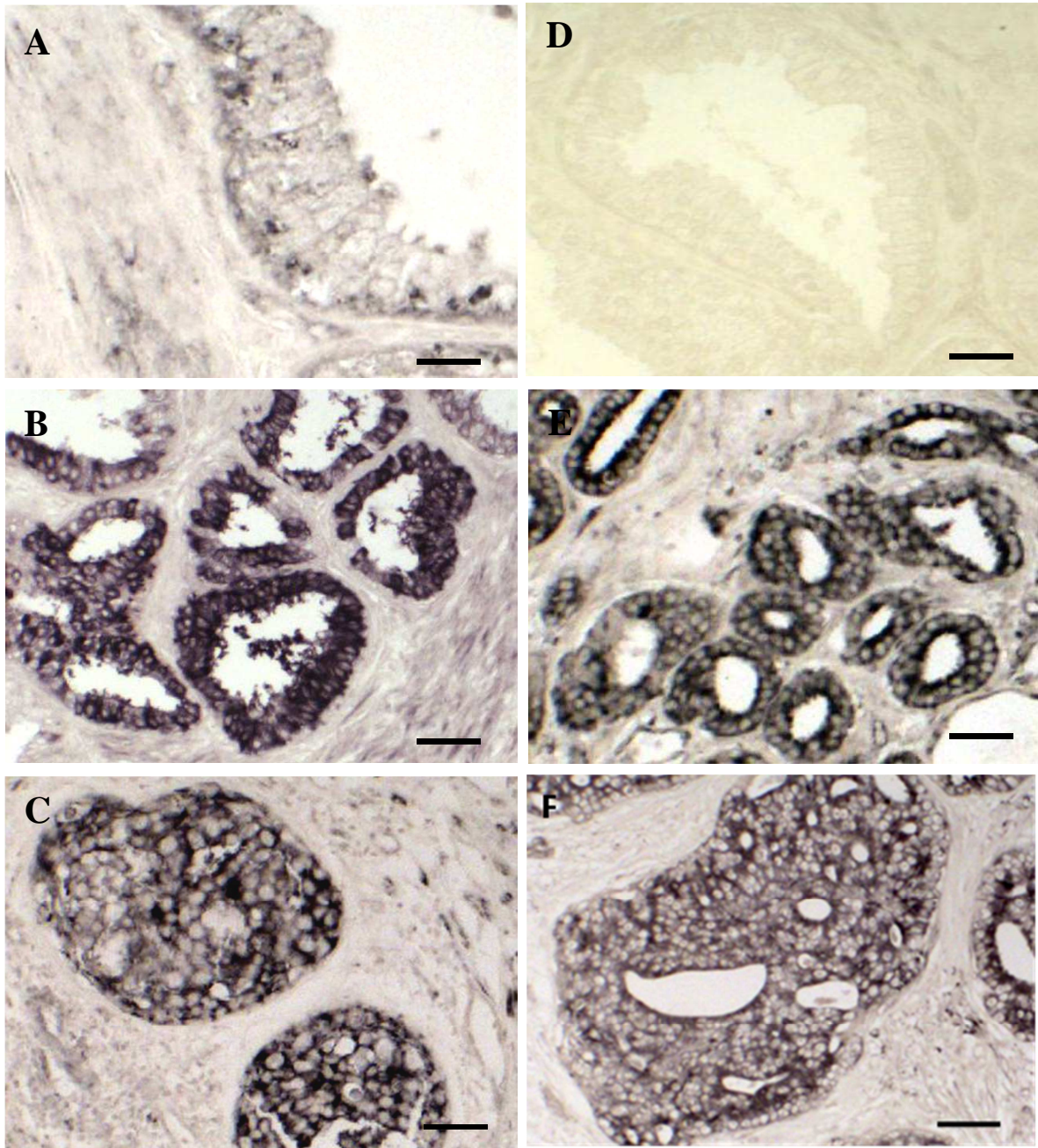


Figura 36: La densidad óptica para p50 fue significativamente menor PN que en Cáncer. A su vez, la densidad fue menor en bajo y medio (B) que en los pacientes de alto Gleason (C). p65 no se expresó en PN (D) y fue aumentando progresivamente con la malignidad (E-F) de la lesión (tanto en citoplasma como en núcleo). Barra: 15 μm (A, E), 20 μm (B), 25 μm (C-D, G) y 30 μm (F, H).

7.- CORRELACIÓN CLÍNICA DE LOS COMPONENTES DE LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN ESTUDIADA

7.1. ANÁLISIS DE FRECUENCIA DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS

Los pacientes se distribuyeron según los parámetros clínicos establecidos (PSA preoperatorio, Gleason score, márgenes quirúrgicos, invasión perineural, ganglios, estadio clínico, estadio patológico, progresión bioquímica y supervivencia) (Tabla 20).

	Media (rango)
<u>Edad (años)</u>	64,48 (51-74)
<u>PSA sérico preoperatorio (ng/ml)</u>	18,67 (0,0-167,0)
	<u>% (n)</u>
<u>PSA sérico preoperatorio</u>	
0-<4 ng/ml	11,8 (11)
4-<10 ng/ml	28,0 (26)
>10 ng/ml	60,2 (56)
<u>Estadio patológico T¹</u>	
II	58,8 (51)
III	20,4 (19)
IV	8,6 (8)
<u>Estadio clínico T²</u>	
I	51,6 (48)
II	43,0 (40)
<u>Gleason score</u>	
≤6	22,6 (21)
7	54,8 (51)
≥8	22,6 (21)
<u>Invasión perineural³ (Si)</u>	7,5 (7)
<u>Invasión en ganglios⁴ (Si)</u>	7,5 (7)
<u>Márgenes quirúrgicos afectados (Si)</u>	31,2 (29)
<u>Progresión bioquímica (Si)</u>	45,2 (42)
<u>Supervivencia (Si)</u>	12,9 (12)

Tabla 20: Parámetros clinicopatológicos de los pacientes estudiados (n=93). ¹: 15 perdidos (n=78). ²: 5 perdidos (n=88). ³: 1 perdido (n=92). ⁴: 10 perdidos (n=83).

7.2. ANÁLISIS DE FRECUENCIA DE LOS FACTORES DE LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN ESTUDIADA

Para cada uno de los factores estudiados, los datos obtenidos mediante inmunohistoquímica se agruparon como positivos o negativos, excepto TNFR1, p50 y p65, al ser prácticamente positivos todos los pacientes. En ambos casos se asignaron valores relativos a la intensidad de tinción entre 0 (negativo) y 4 (muy positivo). Este análisis se representa en la Tabla 21 y 22.

	<u>% (n)</u>
TNF-α	90,3 (84)
TNFR1	93,5 (87)
TRAF2	35,5 (33)
IL-1α	95,7 (89)
IL-1B	26,9 (25)
IL-1RI	90,3 (84)
IL-1RII	79,6 (74)
IL-1Ra	33,3 (31)
IRAK	82,8 (77)
TRAF6	91,4 (85)
RIP	49,5 (46)
NIK	94,6 (88)
Ikk	69,9 (65)
p-Ikk	52,7 (49)
IkB	74,2 (69)
p-IkB	77,4 (72)
p50	98,9 (92)
p65	97,8 (91)

Tabla 21: Porcentaje de pacientes que mostraron inmunorreacción positiva para los componentes de la ruta de transducción estudiada. Véase que TNF- α , TNFR1, IL-1 α , IL-1RI, TRAF-6, NIK, p50 y p65 son positivos en más del 90% de los pacientes estudiados.

	% (n)		% (n)
TNF-α		TNFR1	
0	9.7 (9)	0	6,5 (6)
1	18.3 (17)	1	22,6 (21)
2	21.5 (20)	2	34,4 (32)
3	12.9 (12)	3	32,3 (30)
4	37.6 (35)	4	4,3 (4)
IL-1α		IL-1RI	
0	4.3 (4)	0	9.7 (9)
1	31.2 (29)	1	12.9 (12)
2	54.8 (51)	2	21.5 (20)
3	9.7 (9)	3	19.3 (18)
4	0 (0)	4	36.5 (34)
TRAF-6		NIK	
0	8.6 (8)	0	5.4 (5)
1	41.9 (39)	1	9.7 (9)
2	35.5 (33)	2	57.0 (53)
3	14.0 (13)	3	25.8 (24)
4	0 (0)	4	2.2 (2)
p50		p65	
0	1,1 (1)	0	2,2 (2)
1	16,1 (15)	1	21,5 (20)
2	29 (27)	2	24,7 (23)
3	21,5 (20)	3	26,9 (25)
4	32,3 (30)	4	24,7 (23)

Tabla 22: Distribución de pacientes según el grado de inmunotinción para TNF- α , TNFR1, NIK, p50 y p65. Las agrupaciones realizadas atienden a los valores relativos a la intensidad de tinción entre 0 (negativo) y 4 (muy elevada).

	N-B % (n)	I-A % (n)
TNF-α	28 (26)	72 (67)
TNFR1	29 (27)	71 (66)
IL-1α	35.5 (33)	65.5 (60)
IL-1RI	22.6 (21)	77.4 (72)
TRAF6	50.5 (47)	49.5 (46)
NIK	15.1 (14)	84.9 (79)
p50	17.2 (16)	82.8 (77)
p65	23.7 (22)	76.3 (71)

Tabla 23: Distribución de los pacientes según su grado de inmunotinción. Abreviaturas: N-B, negativa-baja; I-A, intermedia-alta

7.3. CORRELACIÓN ENTRE MARCADORES EN ESTUDIO Y MARCADORES CLÁSICOS (TEST DE SPEARMAN)

Para explorar las correlaciones de los marcadores en estudio con los marcadores establecidos se utilizó el test de Spearman (Tabla 24), donde r es el coeficiente de correlación (cuyo signo y valor indica respectivamente la dirección y el grado de correlación) y p indica la significación estadística.

	TNF- α		TNFRI		TRAF2		IL-1 α		IL-1 β		IL-IRI		IL-IRII		IL-IRa		IRAK-1	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
PSA sérico preoperatorio	0,228	0,028	0,254	0,014	0,190	0,069	0,086	0,413	-0,052	0,619	0,192	0,066	0,024	0,819	-0,124	0,235	-0,138	0,188
Estadio patológico I	0,222	0,051	0,252	0,026	0,353	0,002	0,124	0,698	0,092	0,421	0,257	0,023	0,039	0,903	-0,083	0,472	-0,294	0,009
Estadio clínico I	0,098	0,365	0,221	0,039	0,000	1,000	0,168	0,117	-0,098	0,365	0,083	0,443	0,146	0,174	-0,079	0,466	0,085	0,431
Gleason score	0,036	0,734	0,000	1,000	-0,067	0,524	-0,067	0,524	-0,144	0,167	0,268	0,009	-0,079	0,449	-0,204	0,050	-0,127	0,224
Invasión perineural	-0,002	0,985	-0,002	0,985	-0,215	0,040	-0,042	0,692	-0,083	0,431	0,058	0,580	0,038	0,718	-0,118	0,263	-0,095	0,366
Implicación de ganglios	0,194	0,080	0,026	0,818	-0,048	0,668	0,048	0,668	-0,091	0,413	0,160	0,149	0,055	0,625	-0,125	0,261	0,143	0,199
Márgenes quirúrgicos positivos	0,006	0,958	0,175	0,094	0,180	0,084	0,160	0,126	0,063	0,546	0,086	0,413	-0,119	0,254	-0,082	0,434	-0,124	0,238
Progresión bioquímica	0,238	0,022	0,208	0,046	-0,084	0,425	0,038	0,716	-0,220	0,034	0,250	0,015	0,052	0,619	-0,046	0,660	-0,190	0,068
Supervivencia	0,240	0,021	0,246	0,017	-0,084	0,422	0,151	0,147	0,128	0,220	0,054	0,604	0,036	0,732	-0,204	0,050	-0,164	0,115
	TRAF6		RIP		NIK		IKK		pIKK		IkB		pIkB		p50		p65	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
PSA sérico preoperatorio	-0,426	0,000	-0,031	0,770	-0,096	0,358	0,089	0,396	0,154	0,141	0,023	0,829	0,086	0,410	0,095	0,364	-0,091	0,388
Estadio patológico I	-0,240	0,035	0,203	0,065	-0,101	0,381	0,038	0,740	0,146	0,175	-0,047	0,680	0,240	0,034	-0,162	0,156	0,023	0,842
Estadio clínico I	0,158	0,142	0,066	0,539	0,023	0,834	0,041	0,705	0,154	0,141	-0,210	0,050	-0,131	0,222	0,371	0,000	0,369	0,000
Gleason score	-0,032	0,761	-0,064	0,542	0,000	1,000	0,140	0,183	0,128	0,221	-0,073	0,486	0,153	0,143	0,540	0,014	0,188	0,071
Invasión perineural	-0,123	0,243	-0,123	0,243	-0,001	0,990	-0,175	0,095	-0,142	0,177	0,071	0,501	0,052	0,623	0,132	0,211	0,161	0,126
Implicación de ganglios	-0,025	0,822	0,066	0,539	-0,095	0,394	0,205	0,063	0,112	0,313	0,144	0,080	0,177	0,110	0,148	0,181	0,182	0,099
Márgenes quirúrgicos positivos	0,309	0,003	-0,123	0,243	-0,236	0,230	0,138	0,186	0,126	0,227	-0,133	0,202	0,197	0,058	0,307	0,003	0,156	0,135
Progresión bioquímica	-0,187	0,073	-0,013	0,904	-0,008	0,940	0,184	0,106	0,068	0,520	0,053	0,614	0,146	0,163	0,330	0,001	0,114	0,276
Supervivencia	-0,317	0,002	-0,124	0,234	-0,107	0,307	-0,027	0,797	0,108	0,304	-0,066	0,528	0,131	0,210	0,090	0,388	-0,088	0,403

Tabla 24. Correlación de los marcadores pronósticos para recurrencia bioquímica clásicos con los marcadores en estudio (prueba de Spearman).

7.4. CURVAS DE SUPERVIVENCIA PARA LOS PARÁMETROS CLÍNICOS

El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para los parámetros clínicos mostró los siguientes resultados (Fig. 37):

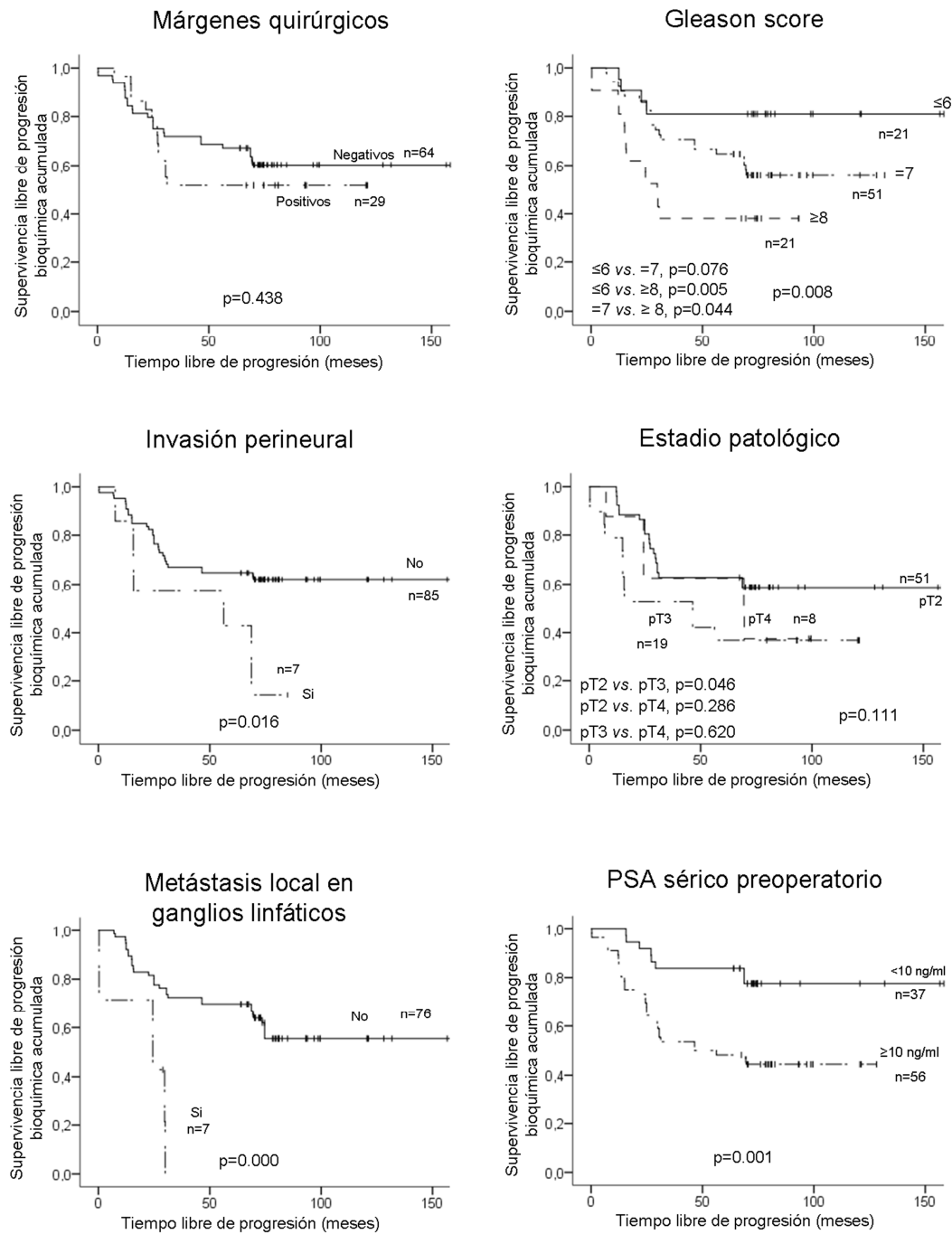


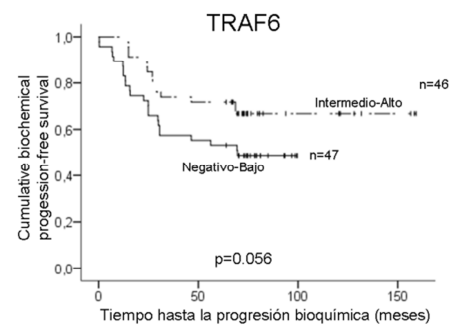
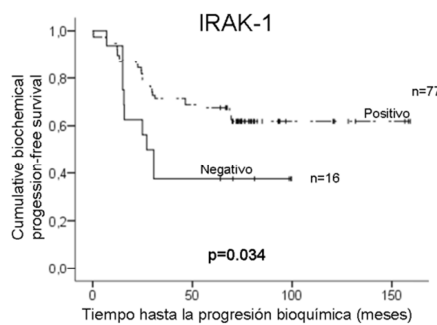
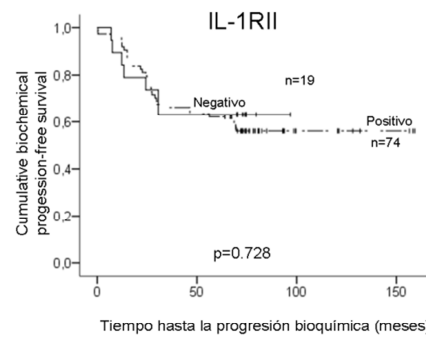
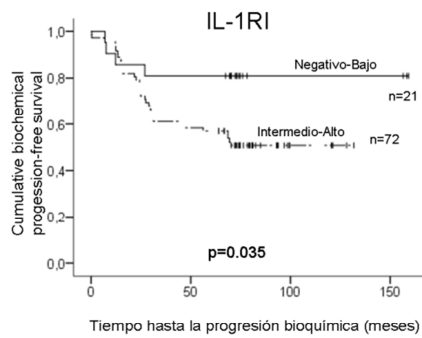
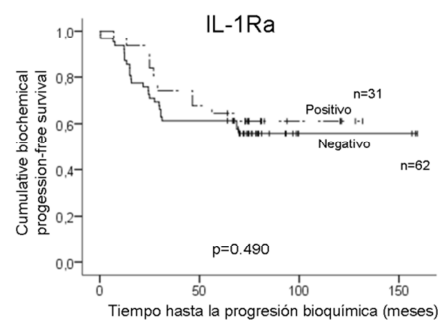
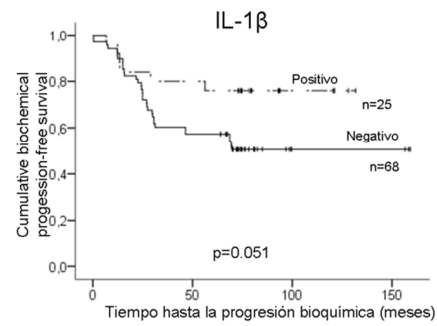
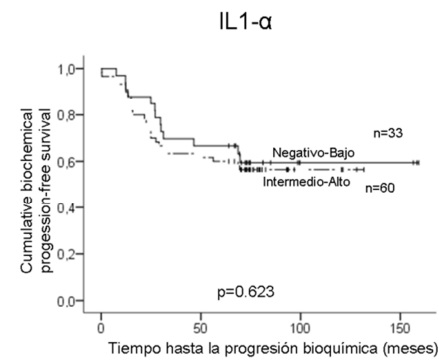
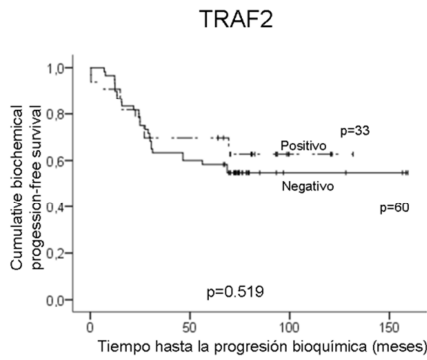
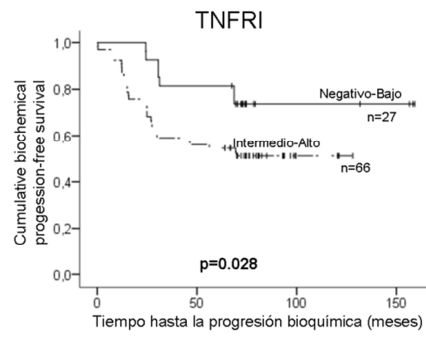
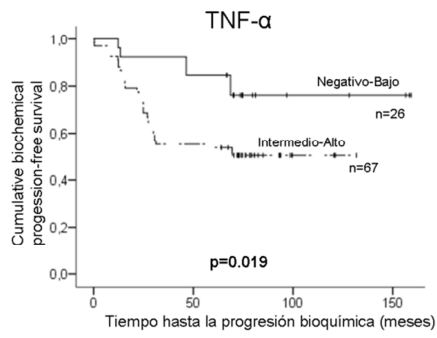
Figura 37. Análisis de Kaplan-Meier de los marcadores establecidos para tiempo libre de recurrencia bioquímica. El valor de p corresponde al test *log-rank*.

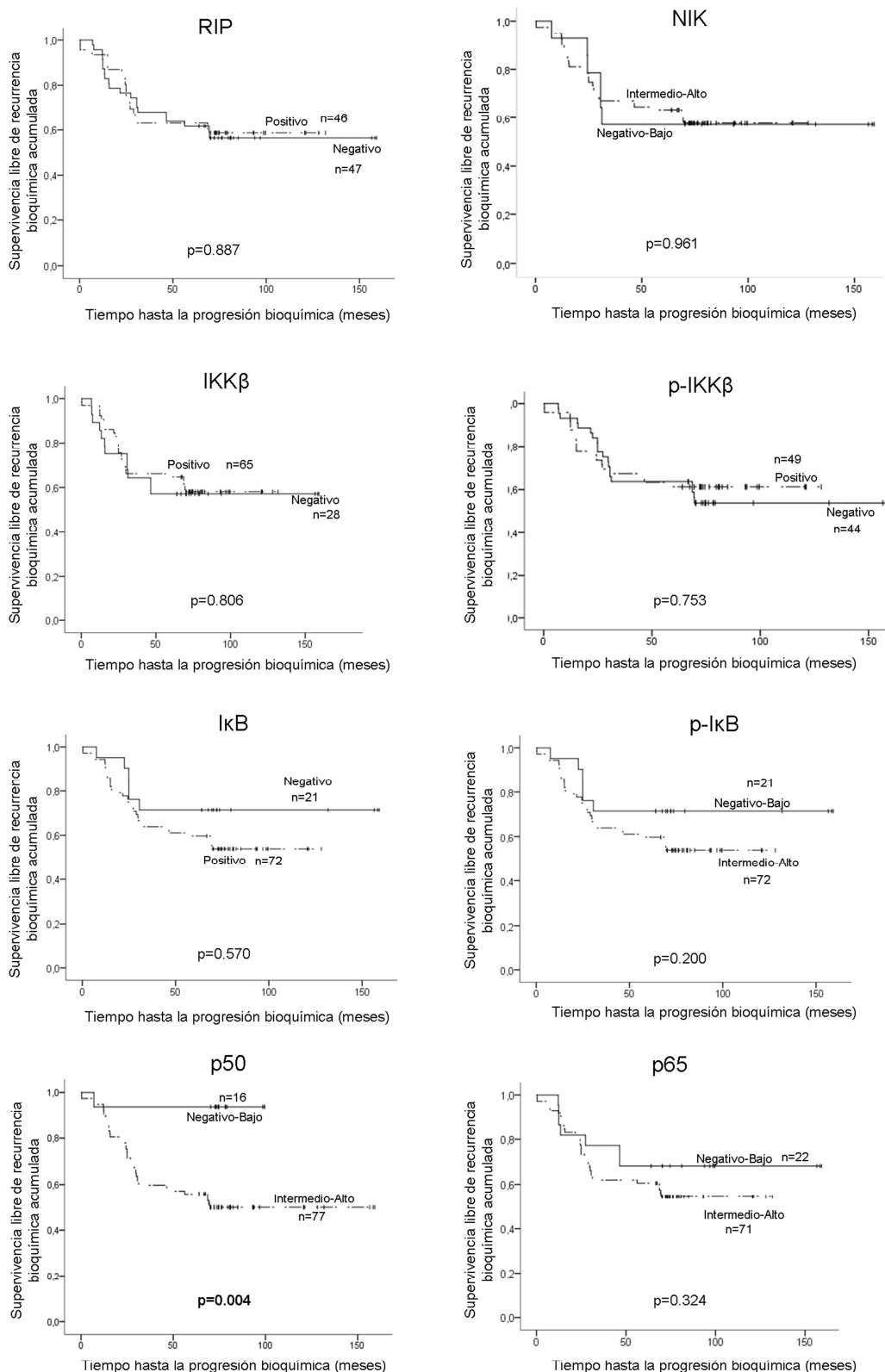
Con estos datos se observó que algunos parámetros clínicos como PSA preoperatorio, ganglios positivos, Gleason score, invasión perineural, estadio clínico y patológico son significativos. Esto significa que están asociados a tiempo libre de recurrencia bioquímica. Por ello, el grupo de pacientes estudiados cumpliría las predicciones clásicas. Sin embargo, el parámetro “márgenes quirúrgicos” no es significativo y, por tanto, no se asociarían con el tiempo libre de recurrencia.

7.5. CURVAS DE SUPERVIVENCIA PARA LOS FACTORES ESTUDIADOS

El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para los diferentes miembros de la ruta de transducción estudiados, mostró los resultados que se observan en las tablas 38 y 39.

Los pacientes con grado de inmunotinción intermedio-alto para TNF- α , TNFRI, IL-1RI y p50 tuvieron tiempos de progresión bioquímica más cortos que aquellos con grado negativo-bajo. Por el contrario los pacientes con una disminución de expresión en IRAK1 tuvieron tiempos de progresión más cortos. Se observó una tendencia para IL-1 β y TRAF-6 habiendo una correlación entre disminución de su expresión y tiempos más cortos de progresión bioquímica.





Figuras 38 y 39. Análisis de Kaplan-Meier de los marcadores estudiados (miembros de la ruta de transducción) para tiempo libre de recurrencia bioquímica. El valor de p corresponde al test *log-rank*.

7.6. ANÁLISIS DE COX UNIFACTORIAL PARA LOS PARÁMETROS CLÍNICOS

Mediante el análisis de riesgo proporcional unifactorial de Cox para los parámetros clínicos estudiados, se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 25):

	Hazard ratio (IC 95%)	valor de p
PSA sérico preoperatorio	3.348 (1.537-7.292)	0.002
Estadio patológico T		
II	Referencia	
III	2.062 (1.013-4.196)	0.046
IV	1.635 (0.616-4.339)	0.323
Puntuación Gleason		
≤6	Referencia	
7	2.479 (0.854-7.200)	0.095
≥8	4.894 (1.590-15.063)	0.006
Invasión perineural	2.789 (1.163-6.690)	0.022
Implicación de ganglios	6.097 (2.529-14.697)	0.000
Márgenes quirúrgicos positivos	1.294 (0.627-2.493)	0.440

Tabla 25: Análisis de Cox unifactorial para los parámetros clínicos. ¹Los pacientes se agruparon en valores según un punto de corte de 10 ng/ml.

En la presente cohorte de pacientes PSA sérico preoperatorio, estadio patológico, puntuación Gleason, invasión perineural y metástasis en ganglios linfáticos locales (no el estatus de los márgenes quirúrgicos) se correlacionaron con el tiempo libre de recurrencia bioquímica.

7.7. ANÁLISIS DE COX UNIFACTORIAL PARA LOS FACTORES ESTUDIADOS

Mediante el análisis de riesgo proporcional unifactorial de Cox para los factores de la ruta de transducción estudiada, se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 26):

	Hazard ratio (IC 95%)	valor de p
TNF-α¹	2.719 (1.138-6.500)	0.024
TNFRI¹	2.432 (1.072-5.515)	0.033
TRAF2	0.800 (0.405-1.580)	0.521
IL-1 α ¹	1.181 (0.607-2.299)	0.624
IL-1B	2.322 (0.971-5.549)	0.058
IL-1RI¹	2.887 (1.025-8.123)	0.045
IL-1RII	1.156 (0.510-2.619)	0.729
IL-1Ra	0.788 (0.399-1.555)	0.492
IRAK-1	0.466 (0.226-0.960)	0.038
TRAF6 ¹	0.539 (0.282-1.027)	0.060
RIP	0.968 (0.621-1.510)	0.887
NIK ¹	1.015 (0.549-1.879)	0.961
I κ B	0.942 (0.582-1.524)	0.806
p-I κ B	0.931 (0.597-1.452)	0.754
I κ B	1.164 (0.687-1.973)	0.572
p-I κ B ¹	1.487 (0.804-2.750)	0.207
p50¹	5.187 (1.273-21.137)	0.022
p65 ¹	1.334 (0.748-2.380)	0.328

Tabla 26: Análisis de Cox unifactorial para los factores estudiados. ¹Se establecieron dos grupos: negativo o de muy baja intensidad de marcaje (score 0-1) y de intensidad media-alta (score 2-4).

Los pacientes con un aumento en la expresión de TNF- α , TNFRI, IL-1RI y p50 tuvieron significativamente más riesgo de progresión. Los pacientes negativos para IRAK-1 estuvieron asociados a mayor riesgo de recurrencia bioquímica. Por otro lado, IL-1B y TRAF-6 permanecieron como factores pronósticos próximos a la significación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para el análisis de Kaplan-Meier.

7.8. ANÁLISIS DE COX MULTIFACTORIAL

Con el objetivo de analizar el valor predictivo de los parámetros estudiados en conjunción con las variables clásicas, realizamos un análisis de riesgos proporcionales de Cox multifactorial. Para evitar un sobreajuste, se decidió incluir en el modelo los marcadores clásicos más importantes (PSA sérico preoperatorio, puntuación Gleason y estadio patológico T) combinados los tres con cada uno de los marcadores estudiados significativos (TNF- α , TNFRI, IL-1RI, p50, IRAK-1) o próximos a la significancia ($p \leq 0.060$; IL-1B y TRAF-6) en el Cox unifactorial por separado.

Únicamente IL-1B resultó ser significativo al ajustar para los efectos de PSA sérico preoperatorio, puntuación Gleason y estadio patológico T, como se muestra en la Tabla 27.

	Hazard ratio (IC 95%)	valor de p
PSA sérico preoperatorio	2.812 (1.182-6.692)	0.019
Estadio T patológico		
II	Referencia	
III	2.467 (1.045-5.824)	0.039
IV	1.026 (0.370-2.843)	0.960
Puntuación Gleason		
≤ 6	Referencia	
7	1.964 (0.663-5.820)	0.223
≥ 8	3.248 (1.025-10.293)	0.045
IL-1B	0.295 (0.130-0.844)	0.023

Tabla 27: Análisis de Cox multifactorial combinando PSA sérico preoperatorio, puntuación Gleason, estadio patológico T y expresión de IL-1B.

IV. DISCUSIÓN

Podemos definir al cáncer como un proceso en el cual tiene lugar una proliferación desordenada e incontrolada de las células de un tejido con el resultado de invadir, desplazar o destruir localmente y/o a distancia otros tejidos del organismo. Se trata de una enfermedad multifactorial, en la cual se ven implicados factores externos e internos. La enfermedad comienza a partir de la acumulación y selección sucesiva de alteraciones genéticas. Aunque en el organismo existe un control que mantiene el equilibrio entre las tasas de crecimiento de las células y la apoptosis de éstas, el cáncer es una patología que evade este control, permitiendo que una célula prolifere de manera descontrolada. Los mecanismos responsables de mantener y reparar el DNA pueden verse afectados por mutaciones hereditarias o esporádicas.

Los diferentes tipos de tumores se denominan atendiendo al tejido dónde se originan, de forma que los denominados **carcinomas** se originarían en el tejido epitelial, y dentro de éste grupo, están los **adenocarcinomas** cuyo origen sería el epitelio glandular. Células epiteliales y estromales producen factores que modifican la matriz extracelular local, estimula la migración y promueve la proliferación celular y supervivencia (Liotta y Kohn, 2001). Las señales de interacción entre las células de cáncer y su microambiente determinan el fenotipo del tumor. Las células del cáncer pueden alterar su estroma adyacente siendo capaz de modular la producción de factores de crecimiento para establecer un entorno propicio para la progresión tumoral (Zins y cols., 2007).

En el inicio de la metástasis la angiogénesis facilita la expansión del tumor primario y proporciona un incremento del área de superficie vascular que permite que el tumor escape dentro de la circulación y la expansión de implantes metastáticos (Li y cols., 2004),

La mayoría de los estudios epidemiológicos sugieren que la incidencia del cáncer de próstata se ha incrementado a lo largo de los años, pero esto puede deberse en parte al perfeccionamiento en la detección y comunicación de los casos de cáncer de próstata. Estudios epidemiológicos muestran que las inflamaciones crónicas frecuentemente preceden la aparición del cáncer (Schulz y cols., 2003; Nahoum, 2006).

Es bien conocido que la interacción entre las células de un tumor y su microambiente puede afectar al crecimiento del tumor y el desarrollo de metástasis. En este microambiente poseen un papel fundamental las citoquinas, pro-inflamatorias que son importantes mediadores de respuestas inflamatorias crónicas y tienen efectos en procesos malignos (Dinarello, 2002; Nahoum, 2006). Entre estas citoquinas estarían TNF- α e IL-1, requeridas para la activación de los factores de transcripción relacionados con

supervivencia y proliferación celular. Por ello, la inflamación podría estar implicada en el desarrollo de cáncer de próstata.

TNF- α Y SU RECEPTOR (TNFRI)

TNF es una citoquina multifuncional, descrita en la mayoría de los órganos e involucrada en apoptosis, supervivencia celular, inflamación e inmunidad actuando mediante la unión a dos receptores (Goodsell, 2006, Van Horssen y cols., 2006, Zins y cols., 2007, Balkwill, 2009).

TNF- α se expresó en el citoplasma de las células epiteliales de la gran mayoría de las muestras estudiadas (próstata normal y cáncer). La intensidad de la inmunorreacción fue similar en los dos grupos y no se observó diferencia significativa entre los grupos. TNF- α ha sido detectado frecuentemente en biopsias de tumores de origen epitelial como son cáncer renal, de ovario, mama o páncreas (Balkwill, 2006). Szlosarek y cols. (2006) en líneas celulares de cáncer de ovario y células tumorales primarias de ovario encontraron que solo las células malignas eran capaces de secretar TNF- α . En ratones deficientes de TNF- α se ha descrito que la sobreexpresión de esta citoquina aumentaba significativamente las metástasis de pulmón (Balkwill, 2009). Todo ello confirma que el aumento en las concentraciones de TNF- α dentro del microambiente del tumor se correlacionan con un mayor riesgo de mortalidad al promover la propagación del tumoral (Zins y cols., 2007).

TNF- α no siempre actúa de la misma forma en cada patología. En algunos tumores provoca necrosis en algunas células mientras que a la vez promueve el crecimiento de otros tipos celulares. Aunque inicialmente se descubrió por su actividad antitumor, actualmente es considerado como uno de los principales mediadores de la inflamación (Pirtskhalaishvili y cols., 2001; Van Horssen y cols., 2006). También es producido por tumores y por ello puede actuar como un promotor de tumor endógeno, relacionándose su función con todos los pasos involucrados en tumorigenesis (Dempsey y cols., 2003; Sethi y cols., 2008a). El amplio rango de respuestas biológicas deriva de la interacción de TNF con sus dos receptores TNFR1 y TNFR2.

En este estudio se observó que el número de muestras positivas para la inmunoexpresión de TNF- α aumentó en muestras diagnosticadas de cáncer. Estudios previos realizados en estos mismos pacientes (Ricote y cols., 2003) muestran un elevado aumento de la proliferación celular. Así, TNF- α podría tener relación con la proliferación celular y por ello, con el aumento de la malignidad (Goodsell, 2006; Zins y cols., 2007).

TNFR1 tiene una importante función en la inmunidad innata por la regulación de la actividad de distintos factores de transcripción como NF- κ B (Verstrepen y cols., 2008). Los receptores de TNF son TNFR1 y TNFR2. TNFR2 se presenta cinco veces más que TNFR1. Sin embargo, TNFR1 se expresa en todos tipos de células, mientras que TNFR2 se expresa principalmente en células inmunes. La principal diferencia entre los dos receptores es el dominio de muerte (DD) de TNFR1 que está ausente en TNFR2 (van Horssen y cols., 2006; Balkwill, 2009). TNFR1 clásicamente se ha relacionado con la inhibición de proliferación, diferenciación, citotoxicidad y apoptosis a través de variados mecanismos: dependiente de caspasas a través de interacción con FADD (Boldin y cols., 1996; Muzio y cols., 1996) o independiente de caspasas mediante la interacción con TRADD (Silke, 2011). Por esta razón, TNFR1 es un importante miembro de la familia de receptores de muerte pues posee la capacidad de inducir apoptosis. El aumento de la producción y liberación de TNF- α se acompaña de la elevación plasmática de las concentraciones de sus receptores. Un desequilibrio a este nivel causa efectos patológicos. Además, TNFR1 se ha estudiado más ampliamente debido a su doble función: induce apoptosis y puede participar en la transducción de señales de supervivencia celular (Van Horssen y cols., 2006).

En nuestro trabajo hemos observado que TNFR1 se expresó en más del 80% de los pacientes en el citoplasma de las células epiteliales. Se observó un aumento de expresión del receptor TNFR1 entre pacientes normales y diagnosticados con cáncer. Sin embargo, estos datos no fueron estadísticamente significativos. Similares resultados fueron descritos por Ricote y cols. (2006) y Nuñez y cols. (2008). TNFR1 se ha descrito en células estromáticas de cáncer renal humano mientras TNFR2 está presente generalmente en el infiltrado de leucocitos (Harrison y cols., 2007; Balkwill, 2009). Estos datos sugieren posibles acciones autocrina y paracrina de TNF- α (Szlosarek y Balkwill, 2003). Rivas y cols. (2008) demostraron que TNF- α inducía proliferación de líneas células tumorales de mama de ratón C4HD y T47D, a través de la activación de la vía p42/p44 MAPK, JNK, PI3-K/Akt y la activación transcripcional de factor nuclear- κ B (NF- κ B).

Estudios moleculares en diferentes líneas celulares de cáncer de próstata describen la presencia del mRNA de TNF- α y TNFR1 (Golovko y cols., 2005). Por ello, deducimos que el TNF- α y TNFR1 detectados en nuestras muestras son producidos en el mismo tejido donde va a ejercer su acción, desarrollando una respuesta tanto de carácter autocrino como paracrino dentro de la glándula prostática. Aunque no encontramos diferencias de expresión de TNF- α y TNFR1 entre las muestras normales y las de cáncer de próstata. Sin

embargo, TNF- α en cáncer podría estar promoviendo un aumento de los procesos de proliferación, que estarían frenados en próstata normal mediante diferentes factores como moléculas que permitan la inhibición de NF-kB o moléculas inductoras de apoptosis.

TRAF-2

TRAF-2 es un intermediario en las rutas de transducción de TNF/Ap-1 (Ricote y cols., 2003; Xiong y cols., 2011) y TNF/NIK/NF-kB (Lee y Lee, 2002; Nuñez y cols., 2008). Una vez que TNF- α se ha unido al TNFR1, el complejo requiere de la proteína adaptadora TRADD, cuya función es reclutar otras proteínas con el dominio DD al complejo receptor. TRADD contiene dos dominios funcionales distintos: un dominio N-terminal que media la unión a TRAF-2 y promueve la activación de NF-kB; y un dominio de muerte en el extremo C-terminal que es requerido para la unión con proteínas como FADD y RIP (Bender y cols., 2005; Tsao y cols., 2007). TRAF-2 y RIP son proteínas efectoras de TNF- α , y median la activación de NF-kB, pero también la activación de p38, ERK y JNK (Devin y cols., 2003).

TRAF-2 se expresó en el citoplasma apical de las células epiteliales mostrando una localización similar a la observada para TNFR1. Quizás se estaría estableciendo una unión entre ambas proteínas, que activaría la vía de transducción de NF-kB. Cuando TNFR1 está presente, TRAF-2 se une al complejo, iniciándose una serie de fosforilaciones secuenciales que desencadenan la activación de factores de transcripción (Van Horssen y cols., 2006). Sin embargo, observamos que el porcentaje de muestras positivas para TRAF-2 disminuyó en las muestras de cáncer de próstata respecto a las normales. Este descenso de muestras positivas se acentuó en alto del grado Gleason.

Trauzold y cols. (2005) describen mediante inmunohistoquímica, altos niveles de TRAF-2 en muestras de cáncer de páncreas en comparación con muestras sin patología descrita, donde la expresión era escasa o nula. Además describen que la sobreexpresión de TRAF-2 produce en estos tumores mayor invasión. Comparando estos resultados con los obtenidos en este estudio, la diferencia que se obtiene al encontrar una baja expresión de TRAF-2 según aumentaba el grado Gleason, podría deberse a que según aumenta el grado Gleason, podría inactivarse nuestra ruta de transducción.

La acción de TRAF-2 y RIP finaliza con la activación de NF-kB a través de NIK y del complejo Ikk (Van Horssen y cols., 2006). RIP al comienzo fue identificada como una proteína de interacción con Fas, posteriormente se demostró que es un componente clave del complejo de señalización TNF/TNFR1/NF-kB (Jackson-Bernitsas y cols., 2007) pues es

una molécula adaptadora de esta ruta de señalización (Devin y cols., 2003; Lee y cols., 2004; Li y Lin, 2008). Devin y cols. (2000) investigaron las funciones respectivas de la activación de Ikk mediada por TNFR1 utilizando fibroblastos RIP^{-/-} y TRAF-2^{-/-}, concluyendo que la activación de Ikk mediada por TNFR1 requiere de ambas proteínas: RIP y TRAF-2.

En próstata normal no hemos observado señal para RIP. Por ello, se cree que en estas condiciones la ruta estaría inactivada. En cáncer de próstata, se expresó en las células epiteliales de más del 40% de los pacientes, lo que hace considerarlo como un marcador tumoral.

Los dominios intracelulares de TNFR1 se unen a proteínas de interacción con receptores (RIP), que con la participación de TRADD pueden generar una bifurcación en las rutas de señalización, ya sea hacia apoptosis o hacia proliferación mediante NF- κ B. Nuestros resultados indicarían que es posible que la ruta de transducción iniciada con TNF- α /TRAF-2 esté participando en la activación de NIK y por tanto en una ruta de transducción que finalizaría con la activación de NF- κ B.

FAMILIA DE IL-1 Y SUS RECEPTORES

IL-1 es una citoquina reguladora cuya llegada a la membrana plasmática y tras la unión a sus receptores de membrana, produce la activación de diferentes rutas de transducción. Debido a su habilidad para estimular la expresión de genes asociados con la inflamación es considerada como una citoquina proinflamatoria (Dinarello, 2002).

En nuestro trabajo no hemos observado inmunoexpresión de IL-1 α en próstata normal lo que sugiere que IL-1 α no ejercería ningún efecto. En las muestras de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata, IL-1 α se detectó en el citoplasma de las células epiteliales quizás favoreciendo la proliferación celular. Aunque el porcentaje de pacientes positivos disminuía según aumentaba el grado Gleason, al observar las densidades ópticas, no se encontraron diferencias significativas. Esta localización citoplasmática ha sido descrita también por Ricote y cols. (2004), que describen que la presencia de IL-1 α citoplasmática se produce ligada a IL-RI, correlacionándolo con el incremento de señal de transducción. El aumento de expresión de IL-1 α se ha descrito en varios tipos de cáncer como son colon (Baier y cols., 2005), estómago (Uefuji y cols., 2005) y páncreas (Tjomsland y cols., 2011) indicando un aumento con la malignidad.

En tejido nervioso se describió la presencia de IL-1B con una localización semejante a IL-1RI y asociada con la secreción del factor de crecimiento neural, asociando la presencia de esta isoforma a la homeostasis tisular (Juric y Carman-Kran, 2001). Observaciones realizadas sobre cultivos normales de células epiteliales atribuyen a IL-1B una función antiproliferativa (Markovics y cols., 2011). En próstata normal IL-1B se expresó en el citoplasma de las células epiteliales. Similar localización se observó en cáncer con bajo y medio grado Gleason, pero con una densidad óptica significativamente menor en normal y medio grado Gleason respecto a Gleason de bajo grado. En muestras con alto grado Gleason no se detectó esta proteína. Por tanto, hay una pérdida de señal a medida que aumenta el grado Gleason. El porcentaje de pacientes positivos también fue disminuyendo con la malignidad de la lesión. En 1998, Hammerberg y colaboradores describieron en células epidérmicas procedentes de psoriasis una estrecha relación entre el grado de diferenciación celular y la expresión de IL-1B, por lo tanto cuanto más indiferenciada es la célula más reducida es la expresión de IL-1B (Kong y cols., 2006).

Durante el desarrollo embrionario de la próstata IL-1 α e IL-1B se encuentran sobreexpresadas mientras que en la próstata adulta normal su expresión se ve reducida (Apte y cols., 2006). Ambas son inducidas significativamente durante la inflamación prostática aguda y crónica. Estos factores inducen el crecimiento del epitelio de la próstata y la expansión del estroma en cultivos celulares (Apte y cols., 2006b; Lewis y cols., 2006). En este estudio se concluye que IL-1 media la señalización necesaria para el desarrollo normal de la próstata y sus efectos en la proliferación celular del epitelio y del estroma.

IL-1Ra es un antagonista natural de IL-1 y miembro de la familia IL-1 que se libera en la circulación sanguínea e impide que IL-1 se una a sus receptores. En los casos de próstata normal y cáncer con alto grado Gleason no se observó señal de IL-1Ra. En los casos de bajo y medio grado Gleason la inmunorreacción se observó en el citoplasma de las células epiteliales y con una densidad óptica significativamente menor en medio que en bajo Gleason. En los resultados obtenidos para IL-1B y IL-1Ra, se observó que el número de pacientes positivos disminuye con el grado Gleason, por ello concluimos que su acción desaparecería en los pacientes cuyo tumor se encuentra en un grado muy avanzado. Hay determinadas situaciones en las que se ha descrito que la sobreproducción de IL-1 y la baja expresión de IL-1Ra predispone al desarrollo de enfermedades de naturaleza variada. Así, la administración local de IL-1Ra provoca una reversión significativa de la enfermedad en el caso de la artritis inflamatoria (Arend, 2002). En el caso de células de leucemia mieloblástica que producen IL-1, y no es común la presencia de ARNm de IL-1Ra, cuando

se obtuvieron cultivos primarios de estas células y se les administró IL-1Ra se observó que se detenía la proliferación celular, sugiriendo que la rotura del balance entre IL-1 e IL-1Ra jugaba un papel decisivo en el control de la proliferación celular (Lindmark y cols., 2005).

Los receptores de IL-1 (IL-1R) han sido reconocidos como parte de la superfamilia de los receptores IL-1/Toll-Like (TLR), cuyos miembros participan en la respuesta inmunitaria innata y en la inflamación (Apte y cols., 2006b, Magne y cols., 2006). El receptor tipo I (IL-1RI) es responsable de todos los efectos biológicos de IL-1. En próstata normal IL-1RI se detectó en el 100% de las muestras pero la señal se restringe al estroma y la intensidad de marcaje es muy baja. El aumento más destacado aparece en muestras con cáncer. Además, la señal aparece tanto en el estroma como en el epitelio por lo que se deduce que la acción de IL-1 es más intensa con el aumento de la malignidad. La correlación de este dato con el marcaje encontrado para IL-1 α sugiere que efectivamente ésta ejerce su acción proliferativa en cáncer. Cuando IL-1 α se une a IL-1RI desencadena una vía de señalización intracelular que incluye la fosforilación proteica mediada por quinasas conocidas como IRAKs (quinasas asociadas al receptor de IL) y responsables de los efectos biológicos de la citoquinas (Dinarello, 2011). Así, IL-1RI se ha descrito como responsable del inicio de la señal de transducción intracelular que activa la proliferación celular (Apte y cols., 2006b). Resultados similares fueron descritos por Ricote y cols. (2006) sugiriendo que esta interacción activa diferentes rutas de transducción que finalizan con la activación de distintos factores de transcripción como NF-kB, Elk-1 ó ATF-2, que favorecen la proliferación celular.

En próstata normal no se obtuvo señal para IL-1RII. En cáncer de próstata, se observó señal en la zona periférica del citoplasma de las células epiteliales, disminuyendo la expresión en medio y alto Gleason respecto al bajo Gleason. IL-1B es el ligando con menor afinidad por la forma de membrana de IL-1RI, por lo cual este ligando se une con mayor afinidad a IL-1RII (Apte y cols., 2006a; Dinarello, 2011). Debido al descenso de expresión de IL-1B, deducimos que esta unión se haría menos activa con el aumento de la malignidad.

El aumento de expresión de IL-1 α e IL-1RI en y cáncer de próstata, unido al descenso de expresión de IL-1B e IL-1Ra podría significar que IL-1 α podría ser el factor más relacionado con la malignidad. Por ello, la evaluación de estas moléculas podría servir para conocer el grado de malignidad del cáncer de próstata.

La dimerización del dominio citoplasmático de IL-1RI e IL-1 α inicia la señal. La asociación de estas dos moléculas es necesaria para el reclutamiento de las proteínas-

quinasas asociadas a IL-1R (IRAK-1, IRAK-2, IRAK-M). Posteriormente IRAK se disocia de este complejo y se asocia con el factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF-6). Una cascada de múltiples fosforilaciones y defosforilaciones secuenciales de diferentes quinasas provoca una activación de proteínas que participan en la traducción y traslocación de factores transcripcionales (particularmente NF- κ B y AP-1) al núcleo (Jiang y cols., 2012).

IRAK

IRAK-1 es un miembro de la familia IRAK que se ha relacionado tradicionalmente con el cáncer de próstata (Sun y cols., 2006). Además, se ha descrito que tiene una función esencial en la activación de NF- κ B asociada a TLR/IL-1R (Toll-like receptor/interleukin-1 receptor) al mediar la asociación y disociación de este complejo de señalización, funcionando como un organizador y transportador en la señalización dependiente de IL-1 (Liu y cols., 2008).

IRAK se detectó en el citoplasma de las células epiteliales en todas las muestras analizadas tanto en próstata normal como en cáncer. Además no se han observado diferencias significativas entre los grupos estudiados. En estudios realizados en ratones transgénicos se observaron variaciones genéticas en varios genes IRAK vinculados con diversas enfermedades tales como infección, arterosclerosis, sepsis, enfermedades autoinmunes y cáncer (Ringwood y Li, 2008).

Tradicionalmente se ha implicado a IRAK-1 en la vía de NF- κ B facilitando la ubiquitinación de TRAF-6 (Cao y cols., 1996). Por ello, creemos que IRAK está participando activamente en esta ruta de transducción. Cao y cols. (1996) describieron en células HEK transfectadas, que IRAK es rápidamente traslocado y comienza una multifosforilación seguida de la estimulación de IL-1. Posteriormente, en estudios de células MRC-5 (células humanas de fibroblasto de pulmón), se demostró que la rápida translocación y fosforilación de IRAK ocurre a continuación de la activación de IL-1, pero no la activación de TNF- α (Qin y cols., 2004). Estudios *in vitro* demostraron que IRAK-1 participa en la activación de NF- κ B por la señalización de IL-1R-TLR (Janssens y Beyaert, 2003).

TRAF-6

Muchas de las funciones de la superfamilia TNFR son reguladas por las proteínas TRAF debido a la unión del dominio citoplasmático de estos receptores a proteínas quinasas o ligasas (Chung y cols., 2002). Se conectan a los receptores de superficie celular involucrados en vías de señalización relacionadas con la regulación de diversas respuestas celulares, que incluyen activación, diferenciación y supervivencia. Por las características estructurales de las proteínas TRAF, funcionan como adaptadores citoplasmáticos al promover la transducción de señal intracelular por su capacidad para unirse a los receptores y potenciar el reclutamiento de proteínas hacia un complejo de señalización. A excepción de TRAF-4 que se localiza principalmente en el núcleo celular, el resto de los miembros de la familia se localizan en el citoplasma de las células (Chung y cols., 2007). TRAF-2, TRAF-5 y TRAF-6 parecen ser los inductores de señales positivas para el crecimiento y proliferación de células que están mediadas por cascadas de quinasas, así como por la inducción de NF- κ B y AP-1 (Chung y cols., 2002; Manna y cols., 2010). De ellos, es TRAF-6 el que interacciona con la región C-terminal de IRAK-1 el cual contiene tres sitios de unión para TRAF-6.

TRAF-6 se localizó en las células epiteliales de próstata normal. El número de casos y la densidad óptica aumentó ligeramente en pacientes con cáncer de próstata y la señal se localizó en las células epiteliales. TRAF-6 funciona como señal de transducción en la vía de NF- κ B que activa NIK en respuesta a citoquinas proinflamatorias (Sun y cols., 2011). Esto nos sugiere que TRAF-6 tiene un importante papel en la señalización de IL-1, como ya sugerían Xiong y cols. (2011).

RIP

RIP es una serina/treonina kinasa que realiza un importante papel en la ruta de transducción TNF- α /NF- κ B. En nuestros resultados no se encontró expresión en próstata normal pero sí en cáncer, disminuyendo significativamente su expresión con el aumento del grado Gleason. Aunque se ha descrito que el dominio kinasa de RIP es prescindible para la activación de NF- κ B, este dominio es necesario para la asociación con el complejo TNFR. Es el dominio intermedio el necesario para la activación de NF- κ B mediado por RIP y tiene una importante función para interactuar con los componentes de señalización como NEMO, la subunidad reguladora del complejo I κ k y otras moléculas. RIP tiene funciones de molécula adaptadora para mediar la vía de señalización de TNF- α (Devin y

cols., 2003; Lee y cols., 2004; Li y Lin, 2008) que podría no siempre encontrarse activada en pacientes con cáncer de próstata.

NIK

NIK (NF- κ B inducible kinase) es el primer componente de la vía de transducción de TNF- α que está encaminada exclusivamente a la activación de NF- κ B (Yang y cols., 2005; Lee y cols., 2008; Sun y cols., 2011). En líneas celulares de cáncer de mamá y pulmón se observó un aumento de la actividad de NIK. Estos datos sugieren que la activación de NIK puede ser un evento común en la progresión del tumor (Yamaguchi y cols., 2009; Saitoh y cols., 2010). Dhawan y Richmond (2001) demostraron que la actividad de Ikk asociado a NIK, así como la expresión de NIK es alta en células de melanoma. En las muestras analizadas en este estudio se observó que NIK se expresaba en el citoplasma de las células epiteliales de próstata normal y cáncer de próstata. Además, la expresión aumentaba significativamente en cáncer de próstata, quizás debido a que podría estar activada por diferentes rutas de transducción: TNF/TRAF-2 o IL-1/IRAK/TRAF-6. Sin embargo, TRAF-2 se detectó en un bajo número de pacientes (disminuye con el grado Gleason). A su vez, todos los pacientes negativos para TRAF-2 son positivos para NF- κ B p-50 y sólo hemos observado un paciente negativo para TRAF-2 y NF- κ B p65. A su vez, sólo hay 4 pacientes negativos para NIK y TRAF-2. Todo ello unido a la elevada expresión de IL-1, IRAK y TRAF-6 que hemos observado nos sugiere que en cáncer de próstata NIK estaría estimulado mayoritariamente por IL-1. La activación de NIK se produciría en determinados procesos patológicos y conlleva la fosforilación del complejo de quinasas inhibitoras de kappa B (Ikk) y con ello la activación de NF- κ B, relacionado tradicionalmente con proliferación celular.

Ikk/p-Ikk/IkB/p-IkB

Ikk α e Ikk β conforman un complejo proteico denominado “signalosoma”, el cual en presencia de señal inducen la fosforilación de IkB, lo cual induciría la activación de NF- κ B (Gasparian y cols., 2002).

En próstata normal, Ikk se detectó en el citoplasma de las células epiteliales. En cáncer de próstata disminuyó el número de pacientes positivos en bajo grado Gleason, pero aumentó en medio y alto Gleason. La densidad óptica fue significativamente mayor cáncer que en normal, pero no se observaron diferencias entre los distintos grados Gleason.

Similar localización fue observada para p-Ikk, sin encontrar diferencias significativas en cuanto a la densidad óptica, aunque el número de pacientes positivos aumentaba con el grado Gleason. Estos resultados nos podrían indicar que este factor estaría participando en la cascada de señales para la activación de IκB y su posterior fosforilación y ubiquitinación.

En un modelo de colitis asociado a cáncer de colon desarrollado en ratón, se ha vinculado cáncer e inflamación, describiéndose que la inactivación de Ikk atenúa la inflamación (Greten y cols., 2004). En otro estudio, también se describió que la inactivación de IκB en enterocitos se traduce en una disminución drástica de tumor debido al aumento de la apoptosis, pero no tiene ningún efecto sobre la proliferación de los enterocitos o el crecimiento del tumor (Luo y cols., 2005). Actualmente se cree que Ikk/NF-κB estaría relacionado con la inflamación y por ello, podría ser considerado como una Diana terapéutica y de prevención del cáncer (Bollrath y Greten, 2009; Arkan y cols., 2011).

En próstata normal se observó escasa señal para IκBα en el citoplasma de las células epiteliales. En cáncer de próstata no sólo aumento significativamente la densidad óptica, también aumentó el número de pacientes positivos que superó el 70%. Sin embargo, no se encontraron variaciones significativas entre los distintos grados Gleason. Ross y colaboradores (2004) describen en cáncer de próstata una disminución en la expresión IκBα correlacionada con el aumento en la expresión nuclear de NF-κB y al grado de tumor.

p-IκB se observó en el citoplasma de las células epiteliales en próstata normal. En cáncer de próstata aumentó significativamente la señal pero no se encontraron variaciones significativas entre los distintos grados Gleason. Se ha descrito un mecanismo de activación de NF-κB en células tumorales que implica el aumento en la fosforilación de IκBα (Sethi y cols., 2008b). Gasparian y cols. (2002) describen que en todos los estudios de células de cáncer de próstata independiente de andrógenos, incluyendo células CL2 derivadas de células LNCaP, IκBα está muy fosforilada. IκBα se expresa más en células de cáncer de próstata independiente de andrógenos que en células dependientes de andrógenos (Gasparian y cols., 2002).

La activación (mediante fosforilación) del complejo Ikk y consecuentemente de IκB (p-IκB), “libera” al dímero NF-κB y permite su translocación nuclear donde actuará en la regulación de determinados genes (Karin 2006; Perkins, 2012). El aumento de la expresión de IκBα e p-IκB que hemos observado en cáncer de próstata (bajo grado

Gleason) sugiere que la fosforilación de IκB y la degradación de IκBα, que aumenta con la translocación nuclear de NF-κB. Aunque la activación de la Ikk es un evento clave en la vía del NF-κB, la ubiquitinación y la posterior degradación de los múltiples factores que regulan el complejo Ikk, son también mecanismos cruciales para la regulación de la vía del NF-κB.

FACTOR NUCLEAR KAPPA B (NF-κB)

La activación del factor nuclear kappaB (NF-κB) está asociada a la fosforilación de su inhibidor κB (IκB) el cual está relacionado con un complejo quinasa conocido como IκB quinasa (Ikk). Cuando IκB se fosforila permite al dímero NF-κB que se transloque al núcleo donde actuará en la regulación de determinados genes (Karin, 2006; Perkins, 2012). NF-κB desempeña una función central en inflamación y promueve la expresión de genes implicados en algunos aspectos del cáncer como supervivencia, proliferación y control del ciclo celular, angiogénesis e invasividad. Por ello, NF-κB podría proporcionar un nexo entre inflamación y cáncer, al ser un componente clave en las vías de señalización extracelular desencadenadas por agentes infecciosos, citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 ó TNF-α), factores de crecimiento y señales procedentes de células necróticas (Perkins, 2012).

En próstata normal, el citoplasma de las células epiteliales aparece escasamente marcado para NF-κB-p50. Sin embargo no se encontró señal para NF-κB/p65. Es posible que la baja expresión de p-IκB sea incapaz de activar la degradación de IκB-α, necesaria a su vez para la translocación nuclear de NF-κB. NF-κB podría activarse mediante distintas rutas de transducción como TNF/TRAF-2 ó IL-1/IRAK/TRAF-6 (de Miguel y cols., 2000; Ricote y cols., 2003). Sin embargo, la activación de NF-κB requiere la sucesiva activación de NIK, el complejo Ikk e IκB y ya se ha descrito la escasa señal detectada para estos intermediarios de la ruta. Por ello concluimos que NF-κB está inactivo en próstata normal.

En cáncer de próstata NF-κB/p50 cambia su localización desde el citoplasma al núcleo, a la vez que NF-κB/p65 también se expresa en el núcleo. Esto estaría relacionado con el aumento de IκB-α y p-IκB observado en CP. Shukla y cols. (2004) también describieron en cáncer de próstata, un aumento progresivo de la expresión de NF-κB/p65 (pero no NF-κB/p50). A su vez, éste se correlacionaría con el aumento de expresión observado para IκBα (Wu y cols., 2009). Cuando NF-κB se localiza en el núcleo (forma activa) puede promover la proliferación celular en cáncer de próstata, regulado mediante la

expresión c-myc, cyclin D1 o IL-6 (Chen y cols, 2002; Suh y Rabson, 2004); pero también por diferentes factores anti-apoptóticos como Bcl-xL (Chen y cols., 2002), proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) (Gyrd-Hansen y cols., 2010) o TRAF- 1 y -2 (Shanmugam y cols., 2006). La localización nuclear de NF-kB/p65 se ha descrito anteriormente por diferentes autores (Ross y cols., 2004; Domingo-Domenech y cols., 2005; Lessard y cols., 2006), aunque sus resultados eran contradictorios. Mientras que Domingo-Domenech y cols. (2005) lo describían como un factor independiente del pronóstico de recidivas bioquímicas, Shukla y cols (2004) así como Lessard y cols. (2006) lo describen como un activador de progresión de cáncer de próstata, pudiendo ser considerado como un marcador predictivo para cáncer de próstata. También se ha descrito NF-kB (p50–p65) como formas activas en algunos cáncer de mama (Dolcet y cols., 2005).

En células de carcinoma cervical se correlacionó el aumento de la señal nuclear y actividad de p65-p50 con la progresión celular (Nair y cols., 2003). También en este estudio la activación de NF-kB en cáncer de próstata parece estar estrechamente relacionada con la malignidad. Si fuera así, el bloqueo de alguno de los elementos que contribuyen a su activación podría ser utilizado en el futuro como una posible terapia para el tratamiento del cáncer de próstata.

En estudios previos se sugiere que en próstata humana la ruta de transducción TNF- α /AP-1 no induce apoptosis en cáncer (Ricote y cols., 2003). En cáncer de próstata el efecto pro-apoptótico de la ruta TNF- α /AP-1 disminuye, en parte por ser inhibida por p21 (a nivel de ASK-1), y con ello la ruta se desvía hacia p38 (Ricote y cols., 2003). A su vez, TRAF-2 (disminuye con el grado Gleason) puede estar involucrado en la activación de NIK, aunque se detectó en una baja proporción de pacientes (Ricote y cols., 2003). Sin embargo, la mayoría de estos pacientes son positivos para NF-kB/p50 y NF-kB/p65. Estos datos sugieren que nuestra ruta de activación podría ser estimulada por otras rutas de transducción, quizás activadas por IL-1, IL-6, TGF-B ó EGF. Estas citoquinas además de NF-kB, son responsables de la activación de otros factores de transcripción como ATF-2 y Elk-1. Por ello la inhibición de estas citoquinas podría ser una posible diana en el tratamiento de cáncer de próstata, pues evitaría no sólo la expresión de los intermediarios sino la de factores de transcripción relacionados con la proliferación.

CORRELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS INMUNOHISTOQUÍMICOS ESTUDIADOS Y LOS MARCADORES CLÁSICOS

Cuando TNF- α es producido por las células tumorales ejerce efectos protumorales a través de diferentes mecanismos. En un modelo de adenocarcinoma de pulmón en ratón se observó que TNF- α derivado de tumores contribuyó a la efusión pleural probablemente al promover la permeabilidad de los vasos sanguíneos, criogénesis y supervivencia de la célula tumoral (Stathopoulos y cols., 2007). Kulbe y cols. (2007) sugieren que TNF- α liberado por tumores de ovario establece una red de citoquinas/quimioquinas que promueve el crecimiento del tumor y la invasión de forma autocrina/paracrina. TNF- α de origen tumoral también incrementa el crecimiento tumoral en otros modelos animales de cáncer de mama, pulmón y melanoma (Li y cols., 2009). En el modelo de melanoma se demostró que la acción protumoral de TNF- α era mediada por células de tipo endotelial que se diferenciaban a partir de monocitos que infiltraban el tumor (Li y cols., 2009). En pacientes de cáncer de próstata niveles elevados de TNF- α en suero fueron correlacionados con enfermedad avanzada y supervivencia reducida. En concordancia con estos resultados, en el presente trabajo se observó que la expresión de TNF- α y TNFRI en tumores prostáticos se asociaba positivamente con los niveles séricos de PSA preoperatorios, extensión tumoral, recurrencia bioquímica y supervivencia reducida. Además la expresión de TRAF-2 (componente clave en la ruta de transducción de TNF- α) también se correlacionó positivamente con la extensión tumoral e invasión perineural. En conjunto todos estos resultados apoyan que la ruta de transducción de TNF- α contribuye al cáncer de próstata. Podría descartarse un efecto directo de TNF- α de manera autocrina en células tumorales de próstata, ya que experimentos *in vitro* han evidenciado el papel citotóxico de esta citoquina cuando se administra a líneas celulares derivadas de cáncer de próstata (Sherwood y cols., 1990; Rodríguez-Berriguete y cols., 2012). TNF- α podría estar ejerciendo sus acciones protumorales al estimular la secreción de mediadores paracrinos en las células no cancerosas del microambiente tumoral, directamente y/o a través de una interacción con las células tumorales.

Diferentes estudios usando distintos modelos animales describen que IL-1B tiene tantos efectos pro- como anti-tumorales. Cuando se inyecta en ratones células de fibrosarcoma transfectadas con formas secretadas de IL-1B se observó una elevada proliferación, inducción de angiogénesis, supresión de la inmunidad antitumoral y

reducción de la supervivencia del animal en comparación con ratones inyectados con células de fibrosarcoma no transfectadas o “mock” (Song y cols., 2003). Sin embargo, la sobreexpresión de IL-1B en células de melanoma redujo el crecimiento tumoral en ratones, muy probablemente mediante la promoción de inmunidad antitumoral mediada por células T (Bjorkdahl y cols., 2000). Estudios *in vivo* han descrito también el papel tumoral de IL-1 α . En ratones inyectados con células de fibrosarcoma transfectadas con IL-1 α y que expresan IL-1 α unida a membrana (pero no secretada), se observó una disminución en la tumorigenicidad de los tumores formado acompañado de infiltración de células mononucleares en el tumor, promoción de la inmunidad antitumoral y una mejora en la supervivencia del animal (Song y cols., 2003). Contrariamente la secreción de IL-1 α procedente de células de melanoma A375P humanas inyectadas en ratones “desnudos” promovió la expresión de moléculas de adhesión (como VCam-1) en células endoteliales de la microvasculatura pulmonar induciendo así la adhesión y el reclutamiento de las células cancerosas y la subsecuente metástasis (Chirivi y cols., 1996). En el presente estudio se encontró una correlación significativa entre la reducción de la expresión de la IL-1B en células tumorales prostáticas y la progresión bioquímica. Por otro lado, la expresión de IL-1RI en las células cancerosas prostáticas se correlacionó positivamente con el estadio patológico T, la puntuación Gleason y la progresión bioquímica. A la vista de todos estos resultados se podría afirmar que la secreción de IL-1B por las células tumorales prostáticas influencia negativamente la progresión bioquímica de forma no autocrina, quizás favoreciendo la inmunidad antitumoral. Por otro lado, la señalización por IL-1B en la célula maligna podría estar favoreciendo la progresión de los tumores localizados así como la recurrencia bioquímica. Algunos autores han demostrado que IL-1B inhibe el crecimiento de las líneas celulares cancerosas prostáticas humanas JCA-1, LNCaP, PC3 y DU-145 (Hsieh y cols., 1995; Culig y cols., 1998). En células LNCaP esta supresión de crecimiento mediada por IL-1B está asociada a diferenciación neuroendocrina (Chiao y cols., 1999), la cual a su vez se ha asociado con mal pronóstico. IL-1B podría influenciar la progresión del cáncer de próstata mediante la inducción de la secreción de citoquinas-quimioquinas que promueven el mantenimiento de un microambiente tumoral como por ejemplo TNF α (Balkwill, 2009; Apte y Voronov, 2008). Como se comentó anteriormente, se ha observado una correlación positiva entre la expresión tumoral de TNF- α y la progresión del cáncer de próstata.

IL-1Ra e IL-1RII podrían ejercer un efecto inhibitorio en la señalización por IL-1, el primero al competir con IL-1 α /B por la unión a IL-1RI y el segundo al secuestrar IL-1 α /B.

En este estudio no se ha observado asociación alguna entre IL-1RII y cáncer de próstata, mientras que una reducción en la expresión de IL-1Ra se correlacionó débilmente con elevada puntuación Gleason y una disminución en la supervivencia. Es difícil atribuir un papel para IL-1Ra en cáncer de próstata ya que sus niveles podrían reflejar los de IL-1 (Bargetzi y cols., 1993) y los efectos de IL-1Ra dependen de los niveles de IL-1 derivado del tumor (Apte y Voronov, 2008).

IRAK-1 y TRAF-6 son mediadores críticos de la ruta de señalización de IL-1. En este trabajo una reducción en la expresión de IRAK-1 y TRAF-6 se asoció con un mayor estadio patológico T. Además, IRAK-1 se asoció significativamente a progresión bioquímica, mientras que para TRAF-6 se observó sólo una tendencia. TRAF-6 fue también negativamente correlacionado con los niveles de PSA sérico preoperatorio y supervivencia total e inversamente a márgenes quirúrgicos positivos. La ausencia de paralelismos entre las relaciones encontradas para la IL-1RI y aquellas para IRAK-1 y TRAF-6 podría ser en parte explicado por la existencia de señalización mediada por IRAK-1/TRAF-6 y desacoplada de IL-1RI. Así IRAK-1 y TRAF-6 participarían en vías de señalización activadas por otros receptores expresados por tumores prostáticos como IL-17R (TRAF-6) (Schwandner y cols., 2000; Steiner, 2003) o receptores de tipo *toll* (tanto TRAF-6 como IRAK-1) (Takeda y cols., 2004; Ilvesaro y cols., 2007).

Las rutas de transducción de TNF α e IL-1 confluyen a nivel de TRAF2 y TRAF-6/IRAK-1 en la vía canónica de la activación de NF- κ B a través de RIP/NIK/I κ k. A pesar de encontrar numerosas correlaciones entre la expresión de los componentes de esta ruta de transducción “aguas arriba” de RIP/NIK/I κ k, con respecto a los componentes de la vía canónica de NF- κ B sólo se encontraron correlaciones para pI κ B, p50 y p65. La fosforilación de I κ B fue positivamente correlacionada con el estadio patológico T. I κ B ejerce un efecto inhibitorio sobre NF- κ B al evitar su translocación nuclear. La fosforilación de I κ B induce la degradación del mismo y la consecuente activación de NF- κ B. La asociación encontrada entre el aumento de la forma fosforilada de I κ B y el grado de extensión del tumor localizado podría ser reflejo de un aumento en la translocación nuclear de NF- κ B, el cual mediaría su efecto protumoral mediante la inducción de genes antiapoptóticas y prosupervivencia. Así, la expresión de p65 se correlacionó positivamente con el estadio clínico T y la expresión de p50 con estadio clínico T, puntuación Gleason, márgenes quirúrgicos positivos y progresión bioquímica, lo cual apoya aún más la implicación de las rutas de transducción de NF- κ B en la progresión del cáncer de próstata.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PRONÓSTICA DE LOS COMPONENTES DE LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN TNF/IL-1/NF- κ B PARA RECURRENCIA BIOQUÍMICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Numerosos componentes de la ruta de transducción de TNF- α e IL-1 se han propuesto como marcadores pronóstico para numerosos cánceres humanos. Así, por ejemplo variantes alélicas o niveles séricos de IL-1B predicen la respuesta del paciente en numerosos tumores como los pancreáticos (Barber y cols., 2000), colon (Lurje y cols., 2009) e hígado (Okamoto y cols., 2010); y se han asociado al riesgo de padecer leucemia linfocítica (Ennas y cols., 2008) y cáncer de pulmón (Kiyohara y cols., 2010) y gástrico (Yu y cols., 2010; Xue y cols., 2010). La expresión tumoral de IL-1B también se ha propuesto como factor pronóstico para pacientes con cáncer esofágico (Cheng y cols., 2012). Varios polimorfismos en el gen que codifica para IL-1Ra se han asociado por ejemplo al pronóstico de cáncer de colon (Lurje y cols., 2009) y gástrico (Xue y cols., 2010); y sus niveles séricos pronosticaron la respuesta de pacientes con tumores de cervix (Fujiwaki y cols., 2003) y hueso (Rutkowski y cols., 2003). Niveles séricos elevados de TNF- α también se han correlacionado con un pronóstico adverso en pacientes con tumores hematológicos (Herrmann y cols., 1992; Warzocha y cols., 1997), y cáncer de riñón (Dosquet y cols., 1997) y próstata (Michalaki y cols., 2004). Variantes alélicas de TNF- α también han sido propuestas como marcadores pronósticos para numerosos tumores (Shimura y cols., 1994; Seidemann y cols., 2005).

La mayoría de los estudios que evalúa la capacidad pronostica de IL-1 y TNF- α se han centrado en sus niveles séricos o variantes alélicas no habiendo ningún estudio que relacione su expresión tumoral y la respuesta del paciente en cáncer de próstata. En el presente trabajo se analizaron las diferencias en los tiempos y los riesgos de recurrencia bioquímica entre los grupos estratificados de acuerdo a sus niveles relativos de expresión proteica mediante curvas de Kaplan-Meier y test de *log-rank*. Se observó un incremento en la expresión de TNF- α , TRAF-2, IL-1RI o p50 que se asoció a tiempos más cortos y mayores riesgos de progresión bioquímica. Por el contrario, los pacientes negativos para IRAK-1 y los pacientes con expresión reducida de TRAF-6, se correlacionaron con pronóstico adverso (débilmente para TRAF-6). Estos resultados manifiestan el potencial de TNF- α , TRAF-2, IL-1, IRAK-1 o p50 como marcadores biológicos para predecir la

recurrencia bioquímica. Además de los ya conocidos y establecidos marcadores pronóstico para el cáncer de próstata, IL-1B tuvo valor pronóstico tras ajustar estos test para los efectos del estadio patológico T, puntuación Gleason y PSA sérico preoperatorio en nuestra cohorte. Por tanto la expresión de IL-1B en el tumor prostático podría constituir un marcador pronóstico independiente y complementario para la recurrencia bioquímica tras la prostatectomía radical.

V. CONCLUSIONES

1. En próstata normal, el citoplasma de las células epiteliales aparece marcado para NIK, Ikk α / β , Ikb α , p-IkB y NF-kB-p50. Esta ramificación de la ruta podría ser activada mediante TNF/TRAF-2 ó IL-1/IRAK/TRAF-6. Sin embargo, esta ruta estaría desactivada, pues no se encontró señal para NF-kB p65, a la vez que NF-kB p50 se localizó en el citoplasma de las células epiteliales y estromáticas.
2. La elevada expresión observada en el citoplasma de las células epiteliales para IL-1, IRAK, TRAF-6 y NIK y la escasa expresión de TRAF-2 sugieren que en cáncer de próstata nuestra ruta de activación podría ser estimulada por IL-1.
3. La activación de NF-kB, evidenciada por su translocación nuclear en cáncer de próstata parece estar estrechamente relacionada con la malignidad.
4. Algunos componentes (TNF- α , TNFRI, TRAF-2, IL-1B, IL-1RI, IRAK-1, TRAF-6, pIkB, p50 y p65) de estas rutas se asocian a características clinicopatológicas adversas de cáncer de próstata.
5. Componentes como TNF- α , TNFRI, IL-1RI, IRAK-1 o p50 (cada uno por separado) podrían ser marcadores pronóstico de recidiva bioquímica.
6. IL-1B podría ser un factor pronóstico independiente y complementario de recurrencia bioquímica tras prostatectomía radical.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal B, Shishodia S, Ashikawa K, Bharti A.: The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2002, 1: 327-341.

Alapont Alacreu JM, Navarro Rosales S, Budía Alba A, España Furió F, Morera Martínez F, Jiménez Cruz JF. PSA and hK2 in the diagnosis of prostate cancer. *Actas Urol Esp*. 2008, 32(6): 575-588.

Albertsen P. Further support for active surveillance in the management of low-volume, low-grade prostate cancer. *Eur Urol*. 2010, 58(6): 836-837.

Albertsen PC, Fryback DG, Storer BE, Kolon TF, Fine J. Long-term survival among men with conservatively treated localized prostate cancer. *JAMA*. 1995, 274(8): 626-631.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biología molecular de la célula*. Ed. Omega. 5a Edición. 2010. Barcelona. España.

Alcaraz A, Hammerer P, Tubaro A, Schröder FH, Castro R. Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review. *Eur Urol*. 2009, 55(4): 864-873.

Alkhateeb S, Alibhai S, Fleshner N, Finelli A, Jewett M, Zlotta A, Nesbitt M, Lockwood G, Trachtenberg J. Impact of positive surgical margins after radical prostatectomy differs by disease risk group. *J Urol*. 2010, 183(1): 145-150.

Allan RW, Sanderson H, Epstein JI. Correlation of minute (0,5 mm or less) focus of prostate adenocarcinoma on needle biopsy with radical prostatectomy specimen: role of prostate specific antigen density. *J Urol*. 2003, 170: 370- 372.

Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR, Fouad MN, Gelmann EP, Kvale PA, Reding DJ, Weissfeld JL, Yokochi LA, O'Brien B, Clapp JD, Rathmell JM, Riley TL, Hayes RB, Kramer BS, Izmirlian G, Miller AB, Pinsky PF, Prorok PC, Gohagan JK, Berg CD; PLCO Project Team. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med*. 2009, 360(13): 1310-1319.

Antenor JA, Roehl KA, Eggener SE, Kundu SD, Han M, Catalona WJ. Preoperative PSA and progression-free survival after radical prostatectomy for Stage T1c disease. *Urology*. 2005, 66(1): 156-160.

Antonarakis ES, Feng Z, Trock BJ, Humphreys EB, Carducci MA, Partin AW, Walsh PC, Eisenberger MA. The natural history of metastatic progression in men with prostate-specific antigen recurrence after radical prostatectomy: long-term follow-up. *BJU Int*. 2012, 109(1): 32-39.

Aprikian AG, Bazinet M, Plante M, Meshref A, Trudel C, Aronson S, Nachabe M, Péloquin F, Déssureault J, Narod S. Family history and risk of prostatic carcinoma in a high risk group in urological patients. *J Urol.* 1995, 154: 404-406.

Apte R, Dotan S, Elkabets M, White M, Reich E, Carmi Y, Song X, Dvozkin T, Krelin Y, Voronov E. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor- host interactions. *Cancer Metastasis Reviews.* 2006, 25: 387-408.

Apte RN, Krelin Y, Song X, Dotan S, Recih E, Elkabets M, Carmi Y, Dvorkin T, White RM, Gayvoronsky L, Segal S, Voronov E. Effects of micro-environment- and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour-host interactions. *Eur J Cancer.* 2006b, 42(6): 751-759.

Apte RN, Voronov E. Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? *Immunol Rev.* 2008, 222: 222-241.

Arellano L, Castillo O, Metrebián E. Concordancia diagnóstica del puntaje de Gleason en biopsia por punción y prostatectomía radical y sus consecuencias clínicas. *Revista Médica de Chile* 2004, 132: 971-978.

Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002, 13: 323-340.

Arkan MC, Greten FR. IKK- and NF- κ B-mediated functions in carcinogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011, 349: 159-169.

Arzoz-Fábregas M, Areal J, Ibarz L, Gago JL, Boix R, Saladié JM. Isolated intraepithelial prostatic neoplasia and positive prostate adenocarcinoma results at repeated biopsy. Review of our series. *Actas Urol Esp.* 2005, 29(8): 735-738.

Ash D, Flynn A, Battermann J, de Reijke T, Lavagnini P, Blank L; ESTRA/EAU Urological Brachytherapy Group; EORTC Radiotherapy Group. ESTRO/EAU/EORTC recommendations on permanent seed implantation for localized prostate cancer. *Radiother Oncol.* 2000, 57(3): 315-321.

Baier PK, Wolff-Vorbeck G, Eggstein S, Baumgartner U, Hopt UT. Cytokine expression in colon carcinoma. *Anticancer Res.* 2005, 25: 2135-2139.

Balkwill F. Tumor necrosis factor and cancer. *Nature.* 2009, 9: 361-370.

Ballentine Carter H, Piantadosi S, Isaacs JT. Clinical evidence for an implication at the multistep of prostate cancer. *J Urol* 1990, 143:742

- Barber MD, Powell JJ, Lynch SF, Fearon KC, Ross JA. A polymorphism of the interleukin-1 beta gene influences survival in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2000, 83: 1443-1447.
- Bargetzi MJ, Lantz M, Smith CG, et al. Interleukin-1 beta induces interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein in humans. *Cancer Res*. 1993, 53: 4010-4013.
- Barry MJ, Muller Jr AJ. Why are a high overdiagnosis probability and a long lead time for prostate cancer screening so important? *J Natl Cancer Inst* 2009, 101: 362-363.
- Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*. 1996, 274: 782-784.
- Ben-Baruch A. Inflammatory cell, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Res*. 2003, 5:31-36.
- Bender LM, Morgan MJ, Thomas LR, Liu Z-G, Thorburn A. The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. *Cell Death Differ*. 2005, 12: 473-481.
- Bennett CL, Ferreira MR, Davis TC, Kaplan J, Weinberger M, Kuzel T, Seday MA, Sartor O. Relation between literacy, race, and stage of presentation among low-income patients with prostate cancer. *J Clin Oncol* 1998, 16:3101-3104.
- Bentel JM, Buchanan G, Tilley WD. Androgen receptor gene mutations in prostate cancer. En: Naz RD(ed.): *Prostate: Basic and clinical aspects*. Boca Raton, Fl: CRC, 1997, 220-244.
- Bhatnagar, V. and R.M. Kaplan, Treatment options for prostate cancer: evaluating the evidence. *Am Fam Physician*, 2005, 71(10): 1915-1922.
- Bill-Axelsson A, Holmberg L, Ruutu M, Häggman M, Andersson SO, Bratell S, Spångberg A, Busch C, Nordling S, Garmo H, Palmgren J, Adami HO, Norlén BJ, Johansson JE; Scandinavian Prostate Cancer Group Study No. 4. Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *N Engl J Med*. 2005, 352(19): 1977-1984.
- Bill-Axelsson A, Holmberg L, Filén F, Ruutu M, Garmo H, Busch C, Nordling S, Häggman M, Andersson SO, Bratell S, Spångberg A, Palmgren J, Adami HO, Johansson JE; Scandinavian Prostate Cancer Group Study Number 4. Radical prostatectomy versus watchful waiting in localized prostate cancer: the Scandinavian prostate cancer group-4 randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008, 100(16): 1144-1154.

Bjorkdahl O, Dohlsten M, Sjogren HO. Vaccination with B16 melanoma cells expressing a secreted form of interleukin-1beta induces tumor growth inhibition and an enhanced immunity against the wild-type B16 tumor. *Cancer Gene Ther.* 2000, 7: 1365-1374.

Blute ML, Bostwick DG, Bergstralh EJ, Slezak JM, Martin SK, Amling CL, Zincke H. Anatomic site-specific positive margins in organ-confined prostate cancer and its impact on outcome after radical prostatectomy. *Urology.* 1997, 50(5): 733-739.

Boccon-Gibod L, Djavan WB, Hammerer P, Hoeltl W, Kattan MW, Prayer-Galetti T, Teillac P, Tunn UW, Boccon-Gibod L, Djavan WB, Hammerer P. Management of prostate-specific antigen relapse in prostate cancer: a European Consensus. *Int J Clin Pract* 2004;58(4):382-390.

Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem.* 1995, 270:7795-7798.

Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell.* 1996, 85(6): 803-815.

Bolla M, van Poppel H, Collette L, van Cangh P, Vekemans K, Da Pozzo L, de Reijke TM, Verbaeys A, Bosset JF, van Velthoven R, Maréchal JM, Scalliet P, Haustermans K, Piérart M; European Organization for Research and Treatment of Cancer. Postoperative radiotherapy after radical prostatectomy: a randomised controlled trial (EORTC trial 22911). *Lancet.* 2005 Aug 13-19;366(9485): 572-578.

Bolla M, de Reijke TM, Van Tienhoven G, Van den Bergh AC, Oddens J, Poortmans PM, Gez E, Kil P, Akdas A, Soete G, Kariakine O, van der Steen-Banasik EM, Musat E, Piérart M, Mauer ME, Collette L; EORTC Radiation Oncology Group and Genito-Urinary Tract Cancer Group. Duration of androgen suppression in the treatment of prostate cancer. *N Engl J Med.* 2009, 360(24): 2516-2527.

Bollrath J, Greten FR. IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO Rep.* 2009, 10(12): 1314-1319

Boraschi D, Bossu P, Macchia G, Ruggiero P, Tagliabue A. Structure-function relationship in the IL-1 family. *Front Biosci.* 1996, 1:270-308.

Boraschi D, Tagliabue A. The interleukin-1 receptor family. *Vitam Horm.* 2006, 74:229-54.

Bostwick DG, Qian J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol.* 2004, 17(3):360-379.

- Bostwick DG, Cheng L. 2008 Urological Surgical pathology. Ed. Mosby Elsevier, 2nd edition, 2008. United Kingdom.
- Bozeman CB, Carver BS, Eastham JA, Venable DD. Treatment of chronic prostatitis lowers serum prostate specific antigen. *J Urol*. 2002, 167(4):1723-1726.
- Bradley J, Pober J. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 2001, 20: 6482-6491.
- Brandt A, Bermejo JL, Sundquist J, Hemminki K. Age-specific risk of incident prostate cancer and risk of death from prostate cancer defined by the number of affected family members. *Eur Urol* 2010, 58: 275-280.
- Bresnihan B. The prospect of treating rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *BioDrugs*. 2001, 15(2):87-97.
- Briganti A, Chun FK, Salonia A, Zanni G, Scattoni V, Valiquette L, Rigatti P, Montorsi F, Karakiewicz PI. Validation of a nomogram predicting the probability of lymph node invasion among patients undergoing radical prostatectomy and an extended pelvic lymphadenectomy. *Eur Urol*. 2006, 49(6): 1019-1026.
- Brothman AR, Peehl DM, Patel AM, McNeal JE. Frequency and pattern of Karyotypic abnormalities in human prostate cancer. *Cancer Res*. 1990, 50:3795-3803.
- Bubici C, Papa S, Pham CG, Zazzeroni F, Franzoso G. NF-kappaB and JNK: an intricate affair. *Cell Cycle*. 2004, 3(12):1524-1529.
- Buja LM, Eigembrodt MI, Eigembrodt EH. Apoptosis and Necrosis. Basic types of cell death. *Arch Pathol Lab Med*. 1993, 117:1208-1214.
- Calvo-Manuel FA y Pérez-Manga G. Cáncer de Próstata. Documentos de Consenso Oncología. 2002. Editorial Nova Sidonia. Madrid.
- Cao Z, Henzel W, Gao X. IRAK: A Kinase Associated with the Interleukin-1 Receptor. *Science*. 1996, 271: 1128-1131.
- Catalona WJ, Smith DS. 5-year tumor recurrence rates after anatomical radical retropubic prostatectomy for prostate cancer. *J Urol*. 1994, 152(5 Pt 2): 1837-1842.
- Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992, 89: 3367-3371.

- Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, Walsh PC. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol*. 1993, 150: 797-802.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975, 72: 3666-3670.
- Chang B, Swift M, Shen M, Fang J, Broude E, Roninson I. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002, 99: 389-394.
- Chen BC, Wu WT, Ho FM, Lin WW. Inhibition of IL-1 β -induced NF- κ B activation by CaMKK occurs through Akt activation, associated with IRAK1 phosphorylation and uncoupling of MyD88. *J Biol Chem*. 2002, 277: 24169-24179.
- Chen G, Goeddel D. TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science* 2002, 296: 1634-1635.
- Cheng L, Song SY, Pretlow TG, Abdul-Karim FW, Kung HJ, Dawson DV, Park WS, Moon YW, Tsai ML, Linehan WM, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Zhuang Z. Evidence of independent origin of multiple tumors from patients with prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998, 90: 233-237.
- Cheng L, Montironi R, Bostwick DG, Lopez-Beltran A, Berney DM. Staging of prostate cancer. *Histopathology*. 2012, 60: 87-117.
- Chiao JW, Hsieh TC, Xu W, Sklarew RJ, Kancherla R. Development of human prostate cancer cells to neuroendocrine-like cells by interleukin-1. *Int J Oncol*. 1999, 15: 1033-1037.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 1996, 81: 505-512.
- Chirivi RG, Chiodoni C, Musiani P, Garofalo A, Bernasconi S, Colombo MP, Giavazzi R. IL-1 α gene-transfected human melanoma cells increase tumor-cell adhesion to endothelial cells and their retention in the lung of nude mice. *Int J Cancer*. 1996, 67: 856-863.
- Chodak GW. The role of conservative management in localized prostate cancer. *Cancer*. 1994, 74(7 Suppl): 2178-2181.
- Chopra D, Raymond E, Januszewski J, Mattingly R. TNF- α mediated apoptosis in normal human prostate epithelial cells and tumor cell lines. *Cancer Lett*. 2004, 203: 145-154.
- Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci*. 2002, 115: 679-688.
- Chung JY, Lu M, Yin Q, Wu H. Structural revelations of TRAF2 function in TNF receptor signaling pathway. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 597: 93-113.

- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997, 326: 1-16.
- Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science.* 1993, 261: 472-475.
- Colotta F, Dowe SK, Sims JE, Mantovani A. The type II “decoy” receptor: A novel regulatory pathway for interleukin-1. *Immunol Today.* 1994, 15: 562-566.
- Coppola V, De Maria R, Bonci D. MicroRNAs and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2010, 17(1): F1-17.
- Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, Bartsch G, Klocker H. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-1, keratinocyte growth factor and epidermal growth factor. *Cancer Res.* 1994, 54: 5474-5478.
- Culig Z, Hobisch A, Herold M, Hittmair A, Thurnher M, Eder IE, Cronauer MV, Rieser C, Ramoner R, Bartsch G, Klocker H, Konwalinka G. Interleukin 1beta mediates the modulatory effects of monocytes on LNCaP human prostate cancer cells. *Br J Cancer.* 1998, 78: 1004-1011.
- Cunha GR. Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future. *Differentiation.* 2008, 76(6): 578-586.
- Debras B, Guillonneau B, Bougaran J, Chambon E, Vallancien G. Prognostic significance of seminal vesicle invasion on the radical prostatectomy specimen. Rationale for seminal vesicle biopsies. *Eur Urol.* 199, 33(3): 271-277.
- Deep G, Gangar SC, Oberlies NH, Kroll DJ, Agarwal R. Isosilybin A induces apoptosis in human prostate cancer cells via targeting Akt, NF- κ B, and androgen receptor signaling. *Mol Carcinog.* 2010, 49(10): 902-912.
- De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol.* 1999, 155(6): 1985-1992.
- De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007, 7(4): 256-269.
- De Miguel MP, Royuela M, Bethencourt F, Santamaría L, Fraile B, Paniagua R. Immunoexpression of Tumour Necrosis Factor- α and its receptors 1 and 2 correlates with proliferation/apoptosis equilibrium in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *Cytokine.* 2000, 12: 535-538.

Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Genhong C. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cyt Growth Factor Rev.* 2003, 14: 193-209.

Denis LJ: Controversies in the management of localised and metastatic prostate cancer. *Eur J Cancer.* 1991, 27: 333-341.

Devin A, Cook A, Lin Y, Rodriguez Y, Kelliher M, Liu Z. The Distinct Roles of TRAF2 and RIP in IKK Activation by TNF-R1: TRAF2 Recruits IKK to TNF-R1 while RIP Mediates IKK Activation. *Immunity.* 2000, 12: 419-429.

Devin A, Lin Y, Liu ZG. The role of the death-domain kinase RIP in tumour-necrosis-factor-induced activation of mitogen-activated protein kinases. *EMBO Rep.* 2003, 4: 623-627.

Dhawan P, Richmond A. A novel NIK-MAPK signaling pathway upregulates NF-kappaB activity in melanoma cells. *J Biol Chem.* 2001, 277: 7920-7928.

Dickinson SI. Premalignant and malignant prostate lesions: pathologic review. *Cancer Control.* 2010, 17(4): 214-222.

Dinarello CA. Biology basis for Interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996, 87: 2095-2147.

Dinarello CA, Moldawer LL. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. A primer for clinicians. Amgen, Thousand Oaks, CA, USA. 1999.

Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumat.* 2002, 20: 1-13.

Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011, 117(14): 3720-3732.

Di Sant'Agnes PA. Neuroendocrine differentiation in human prostatic carcinoma. *Hum Pathol.* 1992, 23: 287-296.

Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 2005, 446: 475-482.

Domingo-Domenech J, Mellado B, Ferrer B, Truan D, Codony-Servat J, Sauleda S, Alcover J, Campo E, Gascon P, Rovira A, Ross JS, Fernandez PL, Albanell J. Activation of nuclear factor-kappaB in human prostate carcinogenesis and association to biochemical relapse. *Br J Cancer.* 2005, 93: 1285-1294.

Dosquet C, Coudert MC, Lepage E, Cabane J, Richard F. Are angiogenic factors, cytokines, and soluble adhesion molecules prognostic factors in patients with renal cell carcinoma? *Clin Cancer Res.* 1997, 3: 2451-2458.

Dower SK, Fanslow W, Jacobs C, Waugh S, Sims JE, Widmer MB. Interleukin-I antagonists. *Ther Immunol.* 1994, 1(2): 113-122.

Eaton CL. Aetiology and pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Current Opinion Urology* 2003, 13: 7-10.

Eastham JA, Kattan MW, Riedel E, Begg CB, Wheeler TM, Gerigk C, Gonen M, Reuter V, Scardino PT. Variations among individual surgeons in the rate of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens. *J Urol.* 2003, 170(6 Pt 1): 2292-2295.

Eastham JA. Prostate-specific antigen doubling time as a prognostic marker in prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol.* 2005, 2(10): 482-491.

Eastham JA, Kuroiwa K, Ohori M, Serio AM, Gorbonos A, Maru N, Vickers AJ, Slawin KM, Wheeler TM, Reuter VE, Scardino PT. Prognostic significance of location of positive margins in radical prostatectomy specimens. *Urology.* 2007, 70(5): 965-969.

Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics.* 1992, 12: 241-253

Elo JP, Kvist L, Leinonen K, Isomaa V, Henttu P, Lukkarinen O, Vihko P. Mutated human androgen receptor gene detected in a prostatic cancer patient is also activated by estradiol. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995, 80: 3494-3500.

Emberton M, Cornel EB, Bassi PF, Fourcade RO, Gómez JM, Castro R. Benign prostatic hyperplasia as a progressive disease: a guide to the risk factors and options for medical management. *Int J Clin Pract.* 2008, 62(7): 1076-1086.

Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, Brendler CB. Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. *JAMA* 1994, 271(5): 368-374.

Epstein JI, Partin AW, Potter SR, Walsh PC. Adenocarcinoma of the prostate invading the seminal vesicle: prognostic stratification based on pathologic parameters. *Urology.* 2000, 56(2): 283-288.

Epstein JI, Amin M, Boccon-Gibod L, Egevad L, Humphrey PA, Mikuz G, Newling D, Nilsson S, Sakr W, Strigley JR, Wheeler TM, Montironi R. Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2005, 216: 34-63.

Evans BA, Harper ME, Daniells CE, Watts CE, Matenhelia S, Green J, Griffiths K. Low incidence of androgen receptor gene mutation polymorphism analysis. *Prostate* 1996, 28: 162-171.

Evans RM. The steroid receptor superfamily. *Science*. 1988, 240: 889-895

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*. 1992, 148: 2207-2216.

Fenton MA, Shuster TD, Fertig AM, Taplin ME, Kolvenbag G, Bubley GJ, Balk SP. Functional characterization of mutant androgen receptors from androgen-independent prostate cancer: *Clin Cancer Res*. 1997, 3: 1383-1388

Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe 2008. *Eur J Cancer* 2010; 46: 765-781

Ferly J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase N° 5, version 2.0. IARC Press, Lyon, 2004.

Finelli A, Trottier G, Lawrentschuk N, Sowerby R, Zlotta AR, Radomski L, Timilshina N, Evans A, van der Kwast TH, Ants Toi A, Jewett MAS, Trachtenberg J, Fleshner NE: Impact of 5 α -Reductase Inhibitors on Men Followed by Active Surveillance for Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2011, 59: 509-514.

Flanigan RC, McKay TC, Olson M, Shankey TV, Pyle J, Waters WB. Limited efficacy of preoperative computed tomographic scanning for the evaluation of lymph node metastasis in patients before radical prostatectomy. *Urology*. 1996, 48(3): 428-432.

Freedland SJ, Aronson WJ, Kane CJ, Terris MK, Presti JC Jr, Trock B, Amling CL. Biochemical outcome after radical prostatectomy among men with normal preoperative serum prostate-specific antigen levels. *Cancer*. 2004, 101(4): 748-753.

Freedland SJ, Mangold LA, Walsh PC, Partin AW. The prostatic specific antigen era is alive and well: prostatic specific antigen and biochemical progression following radical prostatectomy. *J Urol*. 2005, 174(4 Pt 1): 1276-1281.

Freedland SJ, Hotaling JM, Fitzsimons NJ, Presti JC Jr, Kane CJ, Terris MK, Aronson WJ, Amling CL. PSA in the new millennium: a powerful predictor of prostate cancer prognosis and radical prostatectomy outcomes--results from the SEARCH database. *Eur Urol*. 2008, 53(4): 758-764.

Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*. 1994, 78: 1039-1049.

- Fujiwaki R, Iida K, Nakayama K, Kanasaki H, Hata K, Katabuchi H, Okamura H, Miyazaki K. Clinical significance of interleukin-1 receptor antagonist in patients with cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2003, 89: 77-83.
- Gallis B, Prickett KS, Jackson J, Slack J, Schooley K, Sims JE, Dower SK. IL-1 induces rapid phosphorylation of the IL-1 receptor. *J Immunol.* 1989, 143: 3235-3240.
- García-Tuñón I, Ricote M, Ruiz A, Fraile B, Paniagua R, Royuela M. Role of tumor necrosis factor- α and its receptors in human benign breast lesions and tumors (*in situ* and infiltrative). *Cancer Sci.* 2006, 97: 1044-1049.
- Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, Budunova IV. 2002. The role of IKK in constitutive activation of NF- κ B transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci.* 115: 141-151.
- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell.* 2002, 109 Suppl:S81.
- Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Ascherio A, Chute CC, Willett WC. A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1993, 85(19): 1571-1579.
- Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, Talcott J, Hennekens CH, Kantoff PW. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997, 94: 3320-3323.
- Gleason DF. Classification of prostate carcinomas. *Cancer Chemotherapy Reports* 1966, 50: 125-128.
- Golovko O, Nazarova N, Tuohimaa P. Vitamin D-induced up-regulation of tumour necrosis factor alpha (TNF- α) in prostate cancer cells. *Life Sci.* 2005, 77: 562-577.
- González S, Salcedo JL, Martínez MA. Últimos avances en el diagnóstico de la hiperplasia benigna de próstata. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 2005, 39: 171-185.
- Gonzalvo ML, Nakayama M, Lee SM, De Marzo AM, Nelson WG. Detection of GSTP1 methylation in prostatic secretions using combinatorial MSP analysis. *Urology.* 2004, 63(2): 414-418.
- Goodsell D. The Molecular Perspective: Tumor Necrosis Factor. *The Oncologist* 2006, 11: 83-84.
- Granado de la Orden S, Saá Requejo C, Quintás Viqueira A. Situación epidemiológica del cáncer de próstata en España. *Actas Urol Esp* 2006, 30 (6): 574-582.

Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem.* 1995, 270: 13757-13765.

Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* 1995, 83: 793-802.

Grell M, Wajant H, Zimmermann G, Scheurich P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998, 95: 570-575.

Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell.* 2004, 118(3): 285-296.

Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010, 10(8): 561-574.

Hakimi JM, Rondinelli RH, Schoenberg MP, Barrack ER. Androgen-receptor gene structure and function in prostate cancer. *World J Urol.* 1996, 14: 329-337.

Hammerberg C, Bata-Csorgo Z, Voorhees JJ, Cooper KD. IL-1 and IL-1 receptor antagonist regulation during keratinocyte cell cycle and differentiation in normal and psoriatic epidermis. *Arch Dermatol Res.* 1998, 290(7): 367-74.

Hardy DO, Scher HI, Bogenreider T, Sabbatini P, Zhang ZF, Nanus DM, Catterall JF. Androgen receptor CAG repeat lengths in prostate cancer: Correlation with age of onset. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996, 81: 4400-4405.

Harris WP, Mostaghel EA, Nelson PS, Montgomery B. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol.* 2009, 6(2): 76-85.

Harrison M, Obermueller E, Maisey N, Hoare S, Edmonds K, Li NF, Chao D, Hall K, Lee C, Timotheadou E, Charles K, Ahern R, King DM, Eisen T, Corringham R, DeWitte M, Balkwill F, Gore M. Tumor Necrosis Factor α . As a New Target for Renal Cell Carcinoma: Two Sequential Phase II Trials of Infliximab at Standard and High Dose. *J Clin Oncol.* 2007, 25: 4542-4549.

Hayes RB, Liff JM, Pottern LM, Greenberg RS, Schoenberg JB, Schwartz AG, Swanson GM, Silverman DT, Brown LM, Hoover RN. Prostate cancer risk in US blacks and whites with a family history of cancer. *Int J Cancer.* 1995, 60: 361-364.

Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, Mottet N, Schmid HP, van der Kwast T, Wiegel T, Zattoni F; European Association of Urology. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *Eur Urol.* 2011a, 59(1): 61-71.

Heidenreich A, Pfister D, Thüer D, Brehmer B. Percentage of positive biopsies predicts lymph node involvement in men with low-risk prostate cancer undergoing radical prostatectomy and extended pelvic lymphadenectomy. *BJU Int.* 2011b, 107(2): 220-225.

Herrmann F, Helfrich SG, Lindemann A, Schleiermacher E, Huber C, Mertelsmann R. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor predict unresponsiveness to treatment with interferon alfa-2b in chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol.* 1992, 10: 631-634.

Herranz Amo F, Arias Funez F, Arrizabalaga Moreno M, Calahorra Fernández FJ, Carballido Rodríguez J, Diz Rodríguez R, Herrero Payo JA, Llorente Abarca C, Martín Martínez JC, Martínez-Piñeiro Lorenzo L, Mínguez Martínez R, Moreno Sierra J, Rodríguez Antolín A, Tamayo Ruiz JC, Turo Antona J. The prostate cancer in the community of Madrid in 2000 I.- Incidence. *Actas Urol Esp.* 2003, 27(5): 323-34.

Hsieh TC, Chiao JW. Growth modulation of human prostatic cancer cells by interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist. *Cancer Lett.* 1995, 95: 119-123.

Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell.* 1996, 84(2): 299-308.

Hu B, Gilkes DM, Farooqi B, Sebt SM, Chen J. MDMX overexpression prevents p53 activation by the MDM2 inhibitor Nutlin. *J Biol Chem.* 2006, 281(44): 33030-33035.

Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET, Meadows RP, Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature.* 1996, 384: 638-641.

Huland H, Graefen M, Haese A, Hammerer PG, Palisaar J, Pichlmeier U, Henke RP, Erbersdobler A, Huland E, Lilja H. Prediction of tumor heterogeneity in localized prostate cancer. *Urol Clin North Am* 2002, 29(1): 213-222.

Huwiler A, Pfeilschifter J. Interleukin-1 stimulates de novo synthesis of mitogen-activated protein kinase in glomerular mesangial cells. *FEBS Lett.* 1994, 350: 135-138.

Ibelgaufts H. Dictionary of cytokines. Ed. VCH. 5ª Edición. New York, USA. 1995.

Ichikawa T, Ichikawa Y, Dong J, Hawkins AL, Griffin CA, Isaacs WB, Oshimura M, Barrett JC, Isaacs JT. Localization of metastasis suppressor gene(s) for prostatic cancer to the short arm of human chromosome 11. *Cancer Res.* 1992, 52: 3486-3490.

Ilvesaro JM, Merrell MA, Swain TM, Davidson J, Zayzafoon M, Harris KW, Selander KS. Toll like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion in vitro. *Prostate*. 2007, 67: 774-781.

Isaacs WB y Carter BS. Genetic changes associated with prostate cancer in humans. *Cancer Surveys*. 1993, 11: 15-24.

Isaacs WB, Robinson JC, Carmichael M. p53 expression in prostate cancer metastasis: correlation with progression. *J Urol*. 1994, 151: 286-291

Jackson-Bernitsas DG, Ichikawa H, Takada Y, Myers JN, Lin XL, Darnay BG, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Evidence that TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-RIP-TAK1-IKK pathway mediates constitutive NF-kappaB activation and proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 2007, 26(10): 1385-1397.

Janssens S, Beyaert R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell*. 2003, 11: 293-302.

Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*. 2005, 55(1): 10-30.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008, 58(2): 71-96.

Jenster G, de Ruiter PE, van der Korput HA, Kuiper GG, Trapman J, Brinkmann AO. Changes in the abundance of androgen receptor isotypes. Effects of ligand treatment, glutaminestretch variation, and mutation of putative phosphorylation sites. *Biochem*. 1994, 33: 14064-14072

Jiang J, Slivova V, Jedinak A, Sliva D. Gossypol inhibits growth, invasiveness, and angiogenesis in human prostate cancer cells by modulating NF-kB/AP-1 dependent- and independent-signaling. *Clin Exp Metastasis*. 2012, 29(2): 165-178.

Jordán J. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM* .2003, 22: 100-106.

Jones CU, Hunt D, McGowan DG, Amin MB, Chetner MP, Bruner DW, Leibenhaut MH, Husain SM, Rotman M, Souhami L, Sandler HM, Shipley WU. Radiotherapy and short-term androgen deprivation for localized prostate cancer. *N Engl J Med*. 2011, 365(2): 107-118.

Joniau S, Goeman L, Pennings J, Van Poppel H. Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): importance and clinical management. *Eur Urol*. 2005, 48(3): 379-385.

Karnes RJ, Hatano T, Blute ML, Myers RP. Radical prostatectomy for high-risk prostate cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2010, 40(1): 3-9.

Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006, 441: 431.

- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 2000, 18: 621.
- Karin M. Nuclear factor-kB in cancer development and progression. *Nature.* 2006,441: 431-436.
- Karnes RJ, Hatano T, Blute ML, Myers RP. Radical prostatectomy for high-risk prostate cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2010, 40(1): 3-9.
- Kattan MW, Eastham JA, Stapleton AM, Wheeler TM, Scardino PT. A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998, 90(10): 766-771.
- Kattan MW, Wheeler TM, Scardino PT. Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Clin Oncol.* 1999, 17(5): 1499-1507.
- Kattan MW, Zelefsky MJ, Kupelian PA, Scardino PT, Fuks Z, Leibel SA. Pretreatment nomogram for predicting the outcome of three-dimensional conformal radiotherapy in prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2000, 18(19): 3352-3359.
- Kattan MW, Potters L, Blasko JC, Beyer DC, Fearn P, Cavanagh W, Leibel S, Scardino PT. Pretreatment nomogram for predicting freedom from recurrence after permanent prostate brachytherapy in prostate cancer. *Urology.* 2001, 58(3): 393-399.
- Kattan MW, Eastham JA, Wheeler TM, Maru N, Scardino PT, Erbersdobler A, Graefen M, Huland H, Koh H, Shariat SF, Slawin KM, Ohori M. Counseling men with prostate cancer: a nomogram for predicting the presence of small, moderately differentiated, confined tumors. *J Urol.* 2003, 170(5): 1792-1797.
- Kench JG, Clouston DR, Delprado W, Eade T, Ellis D, Horvath LG, Samarasinghe H, Stahl J, Stapleton AM, Egevad L, Srigley JR, Delahunt B. Prognostic factors in prostate cancer. Key elements in structured histopathology reporting of radical prostatectomy specimens. *Pathology.* 2011, 43(5): 410-419.
- Kiyohara C, Horiuchi T, Takayama K, Nakanishi Y. IL1B rs1143634 polymorphism, cigarette smoking, alcohol use, and lung cancer risk in a Japanese population. *J Thorac Oncol.* 2010, 5: 299-304.
- Klotz L. Active surveillance for favourable risk prostate cancer: rationale, risks, and results. *Urol Oncol* 2007, 25: 505-509

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, 28(1): 126-131.

Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Tammela T, Hyytinen E, Isola J, Trapman J, Cleutjens K, Noordzij A, Visakorpi T, Kallioniemi OP. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res.* 1997, 57: 314-319.

Kong J, Grando S, Li YC. Regulation of IL-1 Family Cytokines IL-1R, IL-1 Receptor Antagonist, and IL-18 by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in Primary Keratinocytes. *J Immunol.* 2006, 176: 3780-3787.

Kryczek I, Liu R, Wang G, Wu K, Shu X, Szeliga W, Vatan L, Finlayson E, Huang E, Simeone D, Redman B, Welling TH, Chang A, Zou W. FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease. *Cancer Res.* 2009, 69(9): 3995-4000.

Kuban DA, Thames HD, Levy LB. Radiation for prostate cancer: use of biochemical failure as an endpoint following radiotherapy. *World J Urol.* 2003, 21(4): 253-264. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA.* 1999, 281(17): 1591-1597.

Kulbe H, Thompson R, Wilson JL, et al. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2007, 67: 585-592.

Kupelian P, Kuban D, Thames H, Levy L, Horwitz E, Martinez A, Michalski J, Pisansky T, Sandler H, Shipley W, Zelefsky M, Zietman A. Improved biochemical relapse-free survival with increased external radiation doses in patients with localized prostate cancer: the combined experience of nine institutions in patients treated in 1994 and 1995. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005, 61(2): 415-419.

Kufe D, Pollock R, Weichselbaum R, Bast R, Gansler T, Holland J, Frei III. *Cancer Medicine.* 6th ed. Hamilton. Canada. Chapter 29. 2003.

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. *Cancer Statistics, 1999.* *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 8-31.

Lang SH, Frame FM, Collins AT. Prostate cancer stem cells. *J Pathol.* 2009, 217(2): 299-306.

Large MC and Eggen SE. Active surveillance for low-risk localized prostate cancer. *Oncology.* 2009, 23(11): 974-979.

- Lee SY, Reichlin A, Santana A, Sokol KA, Nussenzweig MC, Choi Y. TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity*. 1997, 7: 703-713.
- Lee TH, Shank J, Cusson N, Kelliher MA. The kinase activity of RIP1 is not required for tumor necrosis factor- α -induced I κ B kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of RIP1 by TRAF2. *J Biol Chem*. 2004, 279: 33185-33191.
- Lee JT, Lehmann BD, Terrian DM, Chappell WH, Stivala F, Libra M, Martelli AM, Steelman LS, McCubrey JA. Targeting prostate cancer based on signal transduction and cell cycle pathways. *Cell Cycle*. 2008, 7(12): 1745-1762.
- Lejeune FJ, Ruegg C, Lienard D. Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol*. 1998, 10: 573-580.
- Lessard L, Karakiewicz PI, Bellon-Gagnon P, Alam-Fahmy M, Ismail HA, Mes-Masson AM, Saad F. Nuclear localization of nuclear factor-kB p65 in primary prostate tumors is highly predictive of pelvic lymph node metastases. *Clin Cancer Res*. 2006, 12: 5741-5745.
- Lewis A, Varghese S, Xu H, Alexander H. 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.
- Li LC, Okino S, Dahiya R. DNA methylation in prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004, 1704: 87-102.
- Li H, Lin X. Positive and negative signaling components involved in TNF α - induced NF- κ B activation. *Cytokine* 2008, 41: 1-8.
- Li B, Vincent A, Cates J, Brantley-Sieders DM, Polk DB, Young PP. Low levels of tumor necrosis factor alpha increase tumor growth by inducing an endothelial phenotype of monocytes recruited to the tumor site. *Cancer Res*. 2009, 69: 338-348.
- Liang J, Saad Y, Lei T, Wang J, Qi D, Yang Q, Kolattukudy PE, Fu M. MCP-induced protein 1 deubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF-kappaB signaling. *J Exp Med*. 2010, 207(13): 2959-2973.
- Lindmark F, Zheng SL, Wiklund F, Bälter KA, Sun J, Chang B, Hedelin M, Clark J, Johansson JE, Meyers DA, Adami HO, Isaacs W, Grönberg H, Xu J. Interleukin-1 receptor antagonist haplotype associated with prostate cancer risk. *Br J Cancer*. 2005, 93(4): 493-497.
- Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001, 411: 375-379.

- Liu G, Park Y, Abraham E. Interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) -1-mediated NF- κ B activation requires cytosolic and nuclear activity. *FASEB J.* 2008, 22: 2285-2296.
- Liu A, Wei L, Gardner WA, Deng CX, Man YG. Correlated alterations in prostate basal cell layer and basement membrane. *Int J Biol Sci.* 2009, 5(3): 276-285.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001, 104: 487-501.
- Luo J, Kamata H, Karin M. IKK/NF- κ B Signaling: Balancing life and death-a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest.* 2005, 115: 2625-2632.
- Luqman S, Pezzuto JM. NF κ B: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother Res.* 2010, 24(7): 949-963.
- Lurje G, Hendifar AE, Schultheis AM, Pohl A, Husain H, Yang D, Manegold PC, Ning Y, Zhang W, Lenz HJ. Polymorphisms in interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor antagonist associated with tumor recurrence in stage II colon cancer. *Pharmacogenet Genomics.* 2009, 19: 95-102.
- Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, 97: 9487-9492.
- Magi-Galluzzi C, Evans AJ, Delahunt B, Epstein JI, Griffiths DF, van der Kwast TH, Montironi R, Wheeler TM, Srigley JR, Egevad LL, Humphrey PA. International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Handling and Staging of Radical Prostatectomy Specimens. Working group 3: extraprostatic extension, lymphovascular invasion and locally advanced disease. *Mod Pathol.* 2011, 24(1): 26-38.
- Magne D, Palmer G, Barton J, Mézin F, Talabot-Ayer D, Bas S, Duffy T, Noger M, Guerne PA, Nicklin MJ, Gabay C. The new IL-1 family member IL-1F8 stimulates production of inflammatory mediators by synovial fibroblasts and articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 2006, 8: R80.
- Man YG, Zhao C, Chen X. A subset of prostate basal cells lacks the expression of corresponding phenotypic markers. *Pathol Res Pract.* 2006, 202(9): 651-662.
- Mancilla J, Ikejima I, Dinarello CA. Glycosylation of the interleukin-1 receptor type I is required for optimal binding of interleukin-1. *Lymphokine Cytokine Res.* 1992, 11: 197-205.
- Manna SK, Babajan B, Raghavendra PB, Raviprakash N, Sureshkumar C. Inhibiting TRAF2-mediated activation of NF- κ B facilitates induction of AP-1. *J Biol Chem.* 2010, 285(15): 11617-11627.

Markovics JA, Araya J, Cambier S, Somanath S, Gline S, Jablons D, Hill A, Wolters PJ, Nishimura SL. Interleukin-1beta induces increased transcriptional activation of the transforming growth factor-beta-activating integrin subunit beta8 through altering chromatin architecture. *J Biol Chem.* 2011, 286(42): 36864-36874.

May MJ, Gosh S. Signal transduction through NF-kB. *Immunol Today.* 1998, 19: 80-88.

McLeod DG, Iversen P, See WA, Morris T, Armstrong J, Wirth MP; Casodex Early Prostate Cancer Trialists' Group. Bicalutamide 150 mg plus standard care vs standard care alone for early prostate cancer. *BJU Int.* 2006, 97(2): 247-254.

Mc Neal JE, Bostwick DG. Intraductal dysplasia: A premalignant lesion of the prostate. *Hum Pathol.* 1986, 17(1):64-71.

McNeal JE, Villers AA, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Histologic differentiation, cancer volume, and pelvic lymph node metastasis in adenocarcinoma of the prostate. *Cancer.* 1990, 66(6): 1225-1233.

Messing EM, Manola J, Yao J, Kiernan M, Crawford D, Wilding G, di'SantAgnese PA, Trump D; Eastern Cooperative Oncology Group study EST 3886. Immediate versus deferred androgen deprivation treatment in patients with node-positive prostate cancer after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy. *Lancet Oncol.* 2006, 7(6): 472-479.

Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J. Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer.* 2004, 90: 2312-2316.

Miyashita T, Reed J. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995, 80: 293-299.

Molinié V, Hervé JM, Lugagne PM, Leuret T, Botto H. Diagnostic utility of a p63/alpha-methyl coenzyme A racemase (p504s) cocktail in ambiguous lesions of the prostate upon needle biopsy. *BJU Int.* 2006, 97(5): 1109-1115.

Moon DO, Choi YH, Moon SK, Kim WJ, Kim GY. Butein suppresses the expression of nuclear factor-kappa B-mediated matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in prostate cancer cells. *Toxicol In Vitro.* 2010, 24(7): 1927-1934.

Moul JW. Prostate specific antigen only progression of prostate cancer. *J Urol* 2000;163(6): 1632-1642.

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-

homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*. 1996, 85(6): 817-827.

Nahoum S. Why Cancer and Inflammation? *Yale J Biol Med*. 2006, 79: 123-130.

Nair A, Venkatraman M, Maliekal TT, Nair B, Karunagaran D. NF-kappaB is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. *Oncogene*. 2003, 22: 50-58.

Natarajan N, Murphy GP, Mettlin C: Prostate cancer in blacks: an update from the American College of Surgeons' patterns of care studies. *J Surg Oncol* 1989, 40: 232-236.

Nelson WG, De Marzo AM, Yegnasubramanian S. Epigenetic alterations in human prostate cancers. *Endocrinology*. 2009, 150(9): 3991-4002.

Neumann M, Naumann M. Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *FASEB J*. 2007, 21: 2642.

Ng VW, Koh M, Tan SY, Tan PH. Is triple immunostaining with 34betaE12, p63, and racemase in prostate cancer advantageous? A tissue microarray study. *Am J Clin Pathol*. 2007, 127(2): 248-253.

Nieto M, Finn S, Loda M, Hahn WC. Prostate cancer: Re-focusing on androgen receptor signaling. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007, 39(9): 1562-1568.

Núñez C, Cansino JR, Bethencourt F, Pérez-Utrilla M, Fraile B, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, Paniagua R, Royuela M. TNF/IL-1/NIK/NF-kappa B transduction pathway: a comparative study in normal and pathological human prostate (benign hyperplasia and carcinoma). *Histopathology*. 2008, 53(2): 166-176.

Oefelein MG, Smith ND, Grayhack JT, Schaeffer AJ, McVary KT. Long-term results of radical retropubic prostatectomy in men with high grade carcinoma of the prostate. *J Urol*. 1997, 158(4): 1460-1465.

Ohori M, Scardino PT, Lapin SL, Seale-Hawkins C, Link J, Wheeler TM. The mechanisms and prognostic significance of seminal vesicle involvement by prostate cancer. *Am J Surg Pathol*. 1993, 17(12): 1252-1261.

Okamoto K, Ishida C, Ikebuchi Y, Mandai M, Mimura K, Murawaki Y, Yuasa I. The genotypes of IL-1 beta and MMP-3 are associated with the prognosis of HCV-related hepatocellular carcinoma. *Intern Med*. 2010, 49(10): 887-895.

Orencole SF, Fantuzzi G, Vannier E, Dinarello CA. Circulating levels of IL-1 soluble receptors in health and after endotoxin or IL-2. *Cytokine*. 1995, 7: 762-765.

Palkowitsch L, Leidner J, Ghosh S, Marienfeld RB. Phosphorylation of serine 68 in the I κ B kinase (IKK)-binding domain of NEMO interferes with the structure of the IKK complex and tumor necrosis factor- α -induced NF- κ B activity. *J Biol Chem*. 2008, 283(1): 76-86.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer*. 1993, 54: 594-606.

Parrondo R, de las Pozas A, Reiner T, Rai P, Perez-Stable C. NF- κ B activation enhances cell death by antimetabolic drugs in human prostate cancer cells. *Mol Cancer*. 2010, 9: 182.

Partin AW, Piantadosi S, Sanda MG, Epstein JI, Marshall FF, Mohler JL, Brendler CB, Walsh PC, Simons JW. Selection of men at high risk for disease recurrence for experimental adjuvant therapy following radical prostatectomy. *Urology*. 1995, 45(5): 831-838.

Partin AW, Kattan MW, Subong EN, Walsh PC, Wojno KJ, Oesterling JE, Scardino PT, Pearson JD. Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update. *JAMA*. 1997, 277(18): 1445-1451.

Peeters ST, Heemsbergen WD, Koper PC, van Putten WL, Slot A, Dielwart MF, Bonfrer JM, Incrocci L, Lebesque JV. Dose-response in radiotherapy for localized prostate cancer: results of the Dutch multicenter randomized phase III trial comparing 68 Gy of radiotherapy with 78 Gy. *J Clin Oncol*. 2006, 24(13): 1990-1996.

Perkins ND. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012, 12(2): 121-132.

Petrow V. The dihydrotestosterone hypothesis of prostate cancer and its therapeutic implications. *Prostate*. 1986, 9: 343-361.

Pfitzenmaier J, Pahernik S, Tremmel T, Haferkamp A, Buse S, Hohenfellner M. Positive surgical margins after radical prostatectomy: do they have an impact on biochemical or clinical progression? *BJU Int*. 2008, 102(10): 1413-1418.

Pienta KJ, Esper PS. Risk factors for prostate cancer. *Ann Intern Med*. 1993, 118: 793-803.

Pienta KJ, Demers R, Hoff M, Kau TY, Montie JE, Severson RK. Effect of age and race on the survival of men with prostate cancer in the Metropolitan Detroit tricountry area, 1973 to 1987. *Urology* 1995, 45: 93-101.

- Pirtskhalaishvili G, Shurin GV, Esche C, Trump DL, Shurin MRTNF- α protects dendritic cells from prostate cancer-induced apoptosis. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 2001, 4: 221-227.
- Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery--what we have learned and where we are going. *J Urol*. 1999, 162(2): 293-306.
- Pollard M, Luckett PH, Schmidt MA: Induction of prostate adenocarcinomas in Lobund Wistar rats by testosterone. *Prostate*. 1982, 3: 563-568.
- Potosky AL, Miller BA, Albertsen PC, Kramer BS. The role of increasing detection in the rising incidence of prostate cancer. *JAMA*. 1995, 273(7): 548-552.
- Potter SR, Epstein JI, Partin AW. Seminal vesicle invasion by prostate cancer: prognostic significance and therapeutic implications. *Rev Urol*. 2000, 2(3): 190-195.
- Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA*. 1999, 281(17): 1591-1597.
- Pullen SS, Dnag TTA, Crute JJ, Kehry Mr. CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs): binding site specific and activation of downstream pathways by distinct TRAFs. *J Biol Chem*. 1999, 95: 9067-9169.
- Qin J, Jiang Z, Qian Y, Casanova JL, Li X. IRAK4 Kinase Activity Is Redundant for Interleukin-1 (IL-1) Receptor-associated Kinase Phosphorylation and IL-1 Responsiveness. *J Biol Chem*. 2004, 279: 26748-26753.
- Rabets JC, Jones JS, Patel A, Zippe GD. Prostate cancer detection with office based saturation biopsy in a repeat biopsy population. *J Urol*. 2004, 172: 94-97.
- Ramsay AK, Leung HY. Signalling pathways in prostate carcinogenesis: potentials for molecular-targeted therapy. *Clin Sci (Lond)*. 2009, 117(6): 209-228.
- Rathmell JC, Thompson CB. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell*. 2002, 109 Suppl: S97-107.
- Ricote M, Royuela M, García Tuñón I, Paniagua R, Fraile B. Pro-apoptotic tumor necrosis factor-alpha transduction pathway in normal prostate, benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J Urol*. 2003, 170: 787-790.
- Ricote M, García-Tuñón 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, 100(7): 1388-1396.

Ricote M, García-Tuñón I, Bethencourt F, Fraile B, Onsurbe P, Paniagua R, Royuela M. The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia. *J Pathol*. 2006, 208(3): 401-407.

Ringwood L, Li L. The involvement of the interleukin-1 receptor-associated kinases (IRAKs) in cellular signaling networks controlling inflammation. *Cytokine*. 2008, 42: 1-7.

Rivas M, Carnevale R, Proietti C, Rosembliit C, Beguelin W, Salatino M, Charreau E, Frahm I, Sapia S, Brouckaert P, Elizalde P, Schillaci R. TNF α acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF- κ B-dependent pathways. *Exp Cell Res*. 2008, 314: 509-529.

Roach M 3rd, Hanks G, Thames H Jr, Schellhammer P, Shipley WU, Sokol GH, Sandler H. Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006, 65(4): 965-974.

Roberts WB y Han M. Clinical significance and treatment of biochemical recurrence after definitive therapy for localized prostate cancer. *Surg Oncol*. 2009, 18(3): 268-274.

Roddam AW, Duffy MJ, Hamdy FC, Ward AM, Patnick J, Price CP, Rimmer J, Sturgeon C, White P, Allen NE; NHS Prostate Cancer Risk Management Programme. Use of prostate-specific antigen (PSA) isoforms for the detection of prostate cancer in men with a PSA level of 2-10 ng/ml: systematic review and meta-analysis. *Eur Urol*. 2005, 48(3): 386-399.

Rodriguez-Berriguete G, Fraile B, Paniagua R, Aller P, Royuela M. Expression of NF-kappaB-related proteins and their modulation during TNF-alpha-provoked apoptosis in prostate cancer cells. *Prostate*. 2012, 72: 40-50.

Roehl KA, Loeb S, Antenor JA, Corbin N, Catalona WJ. Characteristics of patients with familial versus sporadic prostate cancer. *J Urol*. 2006, 176: 2438-2442.

Roehrborn CG, Rosen RC. Medical therapy options for aging men with benign prostatic hyperplasia: focus on alfuzosin 10 mg once daily. *Clin Interv Aging*. 2008, 3: 511-524.

Roemeling S, Roobol MJ, de Vries SH, Gosselaar C, van der Kwast TH, Shroder FH. Prevalence, treatment modalities and prognosis of familial prostate cancer in a screened population. *J Urol*. 2006, 175: 1332-1336.

Romero Cagigal I, Ferruelo Alonso A, Berenguer Sanchez A. Dieta y Cáncer de próstata. *Actas Urol Esp*. 2003, 27: 399-409.

Rosoff PM, Savage N, Dinarello CA. Interleukin-1 stimulates diacylglycerol production in T lymphocytes by a novel mechanism. *Cell*. 1988, 54: 73-81.

Ross RK, Berstein L, Judd H, Hanisch R, Pike M, Henderson BE. Serum testosterone levels in young black and white men. *J Natl Cancer Inst*. 1986, 76: 45-54.

Ross RK, Bernstein L, Lobo RA, Shimizu H, Stanczyk FZ, Pike MC, Henderson BE. 5- α -reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *Lancet* 1992, 339: 887-889.

Ross JS, Kallakury BV, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP Jr, Kaur P, Gray K, Stringer B. Expression of nuclear factor-kB and I κ B α proteins in prostatic adenocarcinomas: correlation of nuclear factor-kB immunoreactivity with disease recurrence. *Clin Cancer Res*. 2004, 10: 2466-2472.

Royuela M, Rodríguez-Berriguete G, Fraile B, Paniagua R. TNF- α /IL-1/NF-kappaB transduction pathway in human cancer prostate. *Histol Histopathol*. 2008, 23(10): 1279-1290.

Rowland SL, Tremblay MM, Ellison JM, Stunz LL, Bishop GA, Hostager BS. A novel mechanism for TNFR-associated factor 6-dependent CD40 signaling. *J Immunol*. 2007, 179(7): 4645-4653.

Rutkowski P, Kaminska J, Kowalska M, Ruka W, Steffen J. Cytokine and cytokine receptor serum levels in adult bone sarcoma patients: correlations with local tumor extent and prognosis. *J Surg Oncol*. 2003, 84: 151-159.

Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, Sugimoto H, Martinez VJ, Iwasaki Y, Matsubara K, Qi X, Saitoh T, Imoto I, Inazawa J, Utsunomiya A, Watanabe T, Masuda T, Yamamoto N, Yamaoka S. Overexpressed NF-kB -inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood*. 2008, 111: 5118-5129.

Sakr WA, Wheeler TM, Blute M, Bodo M, Calle-Rodrigue R, Henson DE, Mostofi FK, Seiffert J, Wojno K, Zincke H. Staging and reporting of prostate cancer--sampling of the radical prostatectomy specimen. *Cancer*. 1996, 78(2): 366-368.

Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE, Crissman JD. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol*. 1993, 150: 379-385.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*. 1997, 91: 443-446.

Sánchez-Chapado M, Olmedilla G, Cabeza M, Donat E, Ruiz A. Prevalence of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia in Caucasian Mediterranean males: an autopsy study. *Prostate*. 2003, 15;54(3):238-247.

- Scardino PT, Weaver R, Hudson MA. Early detection of prostate cancer. *Hum Pathol.* 1992, 23(3): 211-222.
- Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Jessen B, Köllermann J, Minner S, Passow-Drolet A, Mirlacher M, Milde-Langosch K, Graefen M, Haese A, Steuber T, Simon R, Huland H, Sauter G, Erbersdobler A. Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol.* 2008, 21(11): 1371-1378.
- Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Lilja H, Zappa M, Denis LJ, Recker F, Berenguer A, Määtänen L, Bangma CH, Aus G, Villers A, Rebillard X, van der Kwast T, Blijenberg BG, Moss SM, de Koning HJ, Auvinen A; ERSPC Investigators. Screening and prostate –cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med.* 2009, 360: 1320-1328.
- Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV. Molecular biology of prostate cancer. *Mol Human Reprod* 2003, 9: 437-448.
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998, 254: 439-459.
- Schwandner R, Yamaguchi K, Cao Z. Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 in interleukin 17 signal transduction. *J Exp Med.* 2000, 191: 1233-1240.
- Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2005, 23: 9408-9421.
- Seidemann K, Zimmermann M, Book M, Meyer U, Burkhardt B, Welte K, Reiter A, Stanulla M. Tumor necrosis factor and lymphotoxin alfa genetic polymorphisms and outcome in pediatric patients with non-Hodgkin's lymphoma: results from Berlin-Frankfurt-Munster Trial NHL-BFM 95. *J Clin Oncol.* 2005, 23: 8414-8421.
- Shaneyfelt T, Husein R, Bubley G, Mantzoros CS. Hormonal predictors of prostate cancer: a meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2000, 18(4): 847-853.
- Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol.* 1999, 19: 2435-2444.
- Shahinian VB, Kuo YF, Freeman JL, Goodwin JS. Risk of fracture after androgen deprivation for prostate cancer. *N Engl J Med.* 2005, 352(2): 154-164.
- Shanmugam R, Jayaprakasan V, Gokmen-Polar Y, Kelich S, Miller KD, Yip-Schneider M, Cheng L, Bhat-Nakshatri P, Sledge GW Jr, Nakshatri H, Zheng QH, Miller MA, DeGrado T, Hutchins GD, Sweeney CJ. Restoring chemotherapy and hormone therapy sensitivity by parthenolide in a xenograft hormone refractory prostate cancer model. *Prostate.* 2006, 66(14): 1498-1511.

Sharifi N, Gulley JL, Dahut WL. Androgen deprivation therapy for prostate cancer. *JAMA*. 2005, 294(2): 238-244.

Shelley MD, Kumar S, Wilt T, Staffurth J, Coles B, Mason MD. A systematic review and meta-analysis of randomised trials of neo-adjuvant hormone therapy for localised and locally advanced prostate carcinoma. *Cancer Treat Rev*. 2009, 35(1): 9-17.

Sherwood ER, Pitt Ford TR, Lee C, Kozlowski JM. Therapeutic efficacy of recombinant tumor necrosis factor alpha in an experimental model of human prostatic carcinoma. *J Biol Response Mod*. 1990, 9: 44-52.

Shimura T, Hagihara M, Takebe K, Munkhbat B, Odaka T, Kato H, Nagamachi Y, Tsuji K. The study of tumor necrosis factor beta gene polymorphism in lung cancer patients. *Cancer*. 1994, 73(4): 1184-1188.

Shukla S, MacLennan GT, Fu P, Patel J, Marengo SR, Resnick MI, Gupta S. Nuclear factor-kB/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression. *Neoplasia*. 2004, 6: 390-400.

Senderowicz AM. Cyclin-dependent kinases as new targets for the prevention and treatment of cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2002, 16: 1229-1253.

Sensibar JA. Analysis of cell death and cell proliferation in embryonic stages, normal adult, and aging prostates in human and animals. *Microsc Res Tech*. 1995, 30(4): 342-350.

Sethi G, Sung B, Aggarwal B. TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosc*. 2008, 13: 5094-5107.

Sethi G, Sung B, Aggarwal B. Nuclear Factor-kB Activation: From Bench to Bedside. *Exp Biol Med*. 2008b, 233: 21-31.

Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, Weinstein IB. Multiple functions of p27(Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol*. 2000, 183: 18-27.

Sigala I, Zacharatos P, Toumpanakis D, Michailidou T, Noussia O, Theocharis S, Roussos C, Papapetropoulos A, Vassilakopoulos T. MAPKs and NF-kB differentially regulate cytokine expression in the diaphragm in response to resistive breathing. The role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011, 300(5): R1152-R1162.

Silke J. The regulation of TNF signalling: what a tangled web we weave. *Curr Opin Immunol*. 2011, 23(5): 620-626.

Simon MA, Kim S, Soloway MS. Prostate specific antigen recurrence rates are low after radical retropubic prostatectomy and positive margins. *J Urol*. 2006, 175(1): 140-144.

- Sims JE, Dower SK. Interleukin-1 receptors. *Eur Cytokine Netw.* 1994, 5: 539-546.
- Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993, 90: 6155-6159.
- Slack J, McMahan CJ, Waugh S, Schooley K, Spriggs MK, Sims JE, Dower SK. Independent binding of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta to type I and type II interleukin-1 receptors. *J Biol Chem.* 1993, 268: 2513-2524.
- Soloway MS. Editorial comment. Focal positive surgical margins decrease disease-free survival after radical prostatectomy even in organ-confined disease. *Urology.* 2010, 76(5): 1216-1217.
- Song X, Voronov E, Dvorkin T, Fima E, Cagnano E, Benharroch D, Shendler Y, Bjorkdahl O, Segal S, Dinarello CA, Apte RN. Differential effects of IL-1 alpha and IL-1 beta on tumorigenicity patterns and invasiveness. *J Immunol.* 2003, 171: 6448-6456.
- Srigley JR. Key issues in handling and reporting radical prostatectomy specimens. *Arch Pathol Lab Med.* 2006, 130(3): 303-317.
- Stamey TA, Freiha FS, McNeal JE, Redwine EA, Whittemore AS. Localized prostate cancer. *Cancer* 1993, 71(3): 933-938.
- Stamey TA, Caldwell M, McNeal JE, Nolley R, Hemenez M, Downs J. The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years?. *J Urol.* 2004, 172(4 Pt 1): 1297-1301.
- Stathopoulos GT, Kollintza A, Moschos C, Psallidas I, Sherrill TP, Pitsinos EN, Vassiliou S, Karatza M, Papisir SA, Graf D, Orphanidou D, Light RW, Roussos C, Blackwell TS, Kalomenidis I. Tumor necrosis factor-alpha promotes malignant pleural effusion. *Cancer Res.* 2007, 67: 9825-9834.
- Steiner GE, Newman ME, Paikl D, Stix U, Memaran-Dagda N, Lee C, Marberger MJ. Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate.* 2003, 56: 171-182.
- Steinberg DM, Sauvageot J, Piantadosi S, Epstein JI. Correlation of prostate needle biopsy and radical prostatectomy Gleason grade in academic and community settings. *Am J Surg Pathol.* 1997, 21(5): 566-576.
- Steiner MS. Role of peptide growth factors in the prostate: A review. *Urology.* 1993, 42:99-110.
- Stephenson AJ, Slawin KM, Bianco FJ Jr, Scardino PT. Perspectives on the natural history of recurrent prostate cancer after radical prostatectomy, based on the response to salvage radiotherapy. *BJU Int.* 2004, 94(9): 1210-1212.

Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham JA, Dotan ZA, Bianco FJ Jr, Lilja H, Scardino PT. Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. *J Clin Oncol.* 2006, 24(24): 3973-3978.

Stylianou E, Saklatvala J. Interleukin-1. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 1998, 30: 1075-1079.

Suh J, Rabson AB. NF- κ B activation in human prostate cancer: Important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem* 2004, 91: 100-117.

Sun J, Wiklund F, Hsu FC, Bälter K, Zheng SL, Johansson JE, Chang B, Liu W, Li T, Turner AR, Li L, Li G, Adami HO, Isaacs WB, Xu J, Grönberg H. Interactions of sequence variants in interleukin-1 receptor-associated kinase4 and the toll-like receptor 6-1-10 gene cluster increase prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006, 15(3): 480-485.

Sun Y, Niu J, Huang J. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Am J Transl Res.* 2009, 1(2): 148-162.

Sun SC. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res.* 2011, 21(1): 71-85.

Suzuki H, Sato N, Watabe Y, Masai M, Seino S, Shimazaki J. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993, 46: 759-765.

Swanson GP, Goldman B, Tangen CM, Chin J, Messing E, Canby-Hagino E, Forman JD, Thompson IM, Crawford ED. The prognostic impact of seminal vesicle involvement found at prostatectomy and the effects of adjuvant radiation: data from Southwest Oncology Group 8794. *J Urol.* 2008, 180(6): 2453-2457.

Swanson GP, Basler JW. Prognostic factors for failure after prostatectomy. *J Cancer.* 2010, 2: 1-19.

Swindle P, Eastham JA, Ohori M, Kattan MW, Wheeler T, Maru N, Slawin K, Scardino PT. Do margins matter? The prognostic significance of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens. *J Urol.* 2005, 174(3): 903-907.

Szlosarek PW, Balkwill FR. Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol.* 2003, 4(9): 565-573.

Szlosarek PW, Grimshaw MJ, Kulbe H, Wilson JL, Wilbanks GD, Burke F, Balkwill FR. Expression and regulation of tumor necrosis factor- α in normal and malignant ovarian epithelium. *Mol Cancer Therap.* 2006, 5: 382-390.

Taira AV, Merrick GS, Butler WM, Galbreath RW, Lief J, Adamovich E, Wallner KE. Long-term outcome for clinically localized prostate cancer treated with permanent interstitial brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011, 79(5): 1336-1342.

- Takeda K, Iwamoto S, Sugimoto H, Takuma T, Kawatani N, Noda M, Masaki A, Morise H, Arimura H, Konno K. Identity of differentiation inducing factor and tumour necrosis factor. *Nature*. 1986, 323: 338-440.
- Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004, 16: 3-9.
- Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, Ogawa S, Okado H, Miyake S, Mizuno T, Tohyama M. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem*. 1999, 274: 8531-8538.
- Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN, Balk SP. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med*. 1995, 332: 1393-1398.
- Tefilli MV, Gheiler EL, Tiguert R, Banerjee M, Sakr W, Grignon DJ, Pontes JE, Wood DP Jr. Prognostic indicators in patients with seminal vesicle involvement following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *J Urol*. 1998, 160(3 Pt 1): 802-806.
- Theiss M, Wirth MP, Manseck A, Frohmüller HG. Prognostic significance of capsular invasion and capsular penetration in patients with clinically localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *Prostate*. 1995, 27(1): 13-17.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995, 267: 1456-1462.
- Thompson IM, Tangen CM, Paradelo J, Lucia MS, Miller G, Troyer D, Messing E, Forman J, Chin J, Swanson G, Canby-Hagino E, Crawford ED. Adjuvant radiotherapy for pathological T3N0M0 prostate cancer significantly reduces risk of metastases and improves survival: long-term followup of a randomized clinical trial. *J Urol*. 2009, 181(3): 956-962.
- Tjomsland V, Spångeus A, Vävilä J, Sandström P, Borch K, Druid H, Falkmer S, Falkmer U, Messmer D, Larsson M. Interleukin 1 α sustains the expression of inflammatory factors in human pancreatic cancer microenvironment by targeting cancer-associated fibroblasts. *Neoplasia*. 2011, 13(8): 664-675.
- Tracey KJ. Tumor necrosis factor-alpha. In: *The cytokine handbook* Thomson A. (ed). 2^a edición. Academic Press San Diego, CA. USA. 1994.
- Trapasso JG, deKernion JB, Smith RB, Dorey F. The incidence and significance of detectable levels of serum prostate specific antigen after radical prostatectomy. *J Urol*. 1994, 152(5 Pt 2): 1821-1825.

Trauzold A, Roder C, Sipos B, Karsten K, Arlt A, Jiang P, Martin-Subero JI, Siegmund D, Muerkoster S, Pagerols-Raluy L, Siebert R, Wajant H, Kalthoff H. CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells. *FASEB J.* 2005, 19: 620-622.

Tsao DH, Hum WT, Hsu S, Malakian K, Lin LL. The NMR structure of the TRADD death domain, a key protein in the TNF signaling pathway. *Journal of Biomolecular NMR* 2007, 39: 337-342.

Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Increased expression of interleukin-1alpha and cyclooxygenase-2 in human gastric cancer: a possible role in tumor progression. *Anticancer Res.* 2005, 25: 3225-3230.

Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, Carter BS, Karthaus HF, Schaafsma HE, Debruyne FM, Isaacs WB. Expression of the cellular adhesion molecular E-cadherine is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res.* 1992, 52: 5104-5109.

Uribe J. Cáncer de Próstata ¿Por qué se produce el cáncer de próstata? Aproximación a un modelo genético y molecular. *Revista Urológica Colombiana* 2005, 14: 1-14.

Van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate.* 2003, 57(3): 205-225.

Van Horssen R, Ten Hagen T, Eggermont A. TNF- α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. *The Oncologist.* 2006, 11: 397-408.

Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell.* 1999, 96: 245-254.

Verstrepen L, Bekaert T, Chau T, Tavernier J, Chariot A, Beyaert R. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF- κ B: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci.* 2008, 65: 2964-2978.

Villers AA, McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Pathogenesis and biological significance of seminal vesicle invasion in prostatic adenocarcinoma. *J Urol.* 1990, 143(6): 1183-1187.

Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinanen R, Palmberg C, Palotie A, Tammela T, Isola J, Kallioniemi OP. In vitro amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet.* 1995, 9: 401-406

Voulgaris S, Nobes JP, Laing RW, Langley SE. State-of-the-art: prostate LDR brachytherapy. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2008, 11(3): 237-240.

- Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello CA, Apte RN. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003, 100: 2645-2650.
- Voronov E, Carmi Y, Apte RN. Role of IL-1-mediated inflammation in tumor angiogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2007, 601: 265-270.
- Warzocha K, Salles G, Bienvenu J, et al. Prognostic significance of TNF alpha and its p55 soluble receptor in malignant lymphomas. *Leukemia*. 1997, 11 Suppl 3: 441-443.
- Weichselbaum RR, Kufe DW, Hellman S, Rasmussen HS, King CR, Fischer PH, Mauceri HJ. Radiation-induced tumour necrosis factor-alpha expression: clinical application of transcriptional and physical targeting of gene therapy. *Lancet Oncol*. 2002, 3: 665-671.
- Welch HG, Albertsen PC. Prostate cancer diagnosis and treatment after the introduction of prostate-specific antigen screening: 1986-2005. *J Natl Cancer Inst* 2009, 101: 1325-1329
- Whittemore AS, Kolonel LN, Wu AH, John EM, Gallagher RP, Howe GR, Burch JD, Hankin J, Dreon DM, West DW, Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst*. 1995, 87: 652-661.
- Wiegel T, Bottke D, Steiner U, Siegmann A, Golz R, Störkel S, Willich N, Semjonow A, Souchon R, Stöckle M, Rube C, Weissbach L, Althaus P, Rebmann U, Kälble T, Feldmann HJ, Wirth M, Hinke A, Hinkelbein W, Miller K. Phase III postoperative adjuvant radiotherapy after radical prostatectomy compared with radical prostatectomy alone in pT3 prostate cancer with postoperative undetectable prostate-specific antigen: ARO 96-02/AUO AP 09/95. *J Clin Oncol*. 2009, 27(18): 2924-2930.
- Wynder E, Laakso K, Sotarauta M, Rose D: Metabolic epidemiology of prostatic cancer. *Prostate*. 1984, 5: 47-53
- Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer statistics, 1995. *CA Cancer J Clin*. 1995, 45(1): 8-30.
- Wong YN, Freedland S, Egleston B, Hudes G, Schwartz JS, Armstrong K. Role of androgen deprivation therapy for node-positive prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jan 1;27(1): 100-105.
- Winder E, Maruchi M, Whitmore W: Epidemiology of cancer of prostate. *Cancer*. 1971, 28: 344-351.
- Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell*. 2009, 15(5): 416-428.
- Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of the cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev*. 1992, 11: 95-103.

Xiong Y, Qiu F, Piao W, Song C, Wahl LM, Medvedev AE. Endotoxin tolerance impairs IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) 4 and TGF-beta-activated kinase 1 activation, K63-linked polyubiquitination and assembly of IRAK1, TNF receptor-associated factor 6, and I κ B kinase gamma and increases A20 expression. *J Biol Chem.* 2011, 286(10): 7905-7916.

Xue H, Lin B, Ni P, Xu H, Huang G. Interleukin-1B and interleukin-1 RN polymorphisms and gastric carcinoma risk: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010, 25: 1604-1617.

Yamada T, Hiraoka Y, Ikehata M, Kimbara K, Avner BS, Das Gupta TK, Chakrabarty AM. Apoptosis or growth arrest: Modulation of tumor supresor p53's specificity by bacterial redox protein azurin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004, 101: 4770-4774.

Yamaguchi N, Ito T, Azuma S, Ito E, Honma R, Yanagisawa Y, Nishikawa A, Kawamura M, Imai J, Watanabe S, Semba K, Inoue J. Constitutive activation of nuclear factor-kappaB is preferentially involved in the proliferation of basal-like subtype breast cancer cell lines. *Cancer Sci.* 2009, 100(9): 1668-1674.

Yang CH, Murti A, Pfeffer LM. Interferon Induces NF- κ B-inducing Kinase/Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor-dependent NF- κ B Activation to Promote Cell Survival. *J Biol Chem.* 2005, 280: 31530-31536.

Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, Mak TW. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science.* 1998, 279: 1954-1958.

Yu J, Zeng Z, Wang S, Tian L, Wu J, Xue L, Lee CW, Zhang M, Goggins WB, Chen M, Hu P, Sung JJ. IL-1B-511 polymorphism is associated with increased risk of certain subtypes of gastric cancer in Chinese: a case-control study. *Am J Gastroenterol.* 2010, 105(3): 557-564.

Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature.* 1998, 392: 296-300.

Zincke H, Oesterling JE, Blute ML, Bergstralh EJ, Myers RP, Barrett DM. Long-term (15 years) results after radical prostatectomy for clinically localized (stage T2c or lower) prostate cancer. *J Urol.* 1994, 152(5 Pt 2): 1850-1857.

Zins K, Abraham D, Sioud M, Aharinejad S. Colon Cancer Cell-Derived Tumor Necrosis Factor-Mediates the Tumor Growth-Promoting Response in Macrophages by Up-regulating the Colony-Stimulating Factor-1 Pathway. *Cancer Res.* 2007, 67: 1038-1045.

Zhivotovsky B, Orrenius S. Defects in the apoptotic machinery of cancer cells: role in drug resistance. *Semin Cancer Biol.* 2003, 13: 125-34.

Zumoff B, Levin J, Strain GW, Rosenfeld RS, O`connor JH, Freed SZ, Kream J, Whitmore WS, Fukushima DK, Hellman L. Abnormal levels of plasma hormones in men with prostate cancer: evidence toward a two-disease theory. *Prostate.* 1982, 3: 579-588

PÁGINAS WEB CONSULTADAS:

<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=905>

<http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/prostate.asp>

<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=902>

<http://www.nlm.nih.gov/>

<http://www.upmccancercenters.com/cancer/prostate/gradingsystems.html>

<http://bionmr-c1.unl.edu%20/TNFDD%20/TNFDD.html>

<http://www.sgul.ac.uk%20/depts/immunology/~dash/apoptosis/signaling.html>

<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology>