



Universidad
de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2016/17

DOCTORANDO: TORREALBA ABACHE, NORELIA ROSA

PROGRAMA DE DOCTORADO: D356 DOCTORADO EN GENÉTICA Y BIOLOGÍA CELULAR
DEPARTAMENTO DE: BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

En el día de hoy 21/04/17, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de M^{ra} MAR ROYUELA GARCÍA // BENITO FRAILE LAIZ.

Sobre el siguiente tema: *RUTAS DE TRANSDUCCIÓN CELULAR MEDIADAS POR ERK EN PRÓSTATA NORMAL Y PATOLÓGICA*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL⁶ de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares, 21 de ABRIL de 2017

EL PRESIDENTE

Fdo.: RICARDO PANAGUA

EL SECRETARIO

Fdo.: IGNACIO GARCIA-TURON

EL VOCAL

Fdo.: ERCMIN RODRIGUEZ

Con fecha 25 de abril de 2017, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- Conceder la Mención de "Cum Laude"
 No conceder la Mención de "Cum Laude"

FIRMA DEL ALUMNO,

La Secretaria de la Comisión Delegada

Fdo.: NORELIA ROSA TORREALBA ABACHE

⁶ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:



Universidad
de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 25 de abril, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *TORREALBA ABACHE, NORELIA ROSA*, el día 21 de abril de 2017, titulada *RUTAS DE TRANSDUCCIÓN CELULAR MEDIADAS POR ERK EN PRÓSTATA NORMAL Y PATOLÓGICA*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 26 de abril de 2017

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO



Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:

Doctorando: TORREALBA ABACHE, NORELIA ROSA

Secretario del Tribunal: IGNACIO GARCÍA-TUÑÓN LLANIO

Directores de Tesis: M^ª MAR ROYUELA GARCÍA // BENITO FRAILE LAIZ



Programa de Doctorado en: Genética y Biología
Celular

**RUTAS DE TRANSDUCCIÓN CELULAR MEDIADAS
POR ERK EN PRÓSTATA NORMAL Y
PATOLÓGICA**

Tesis Doctoral presentada por:

NORELIA ROSA TORREALBA ABACHE

Directores:

Dra. M. Mar Royuela García

Dr. Benito Fraile Láiz

Alcalá de Henares, 2017

**JUAN SOLIVERI DE CARRANZA, CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA Y
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA Y
BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ,**

INFORMA:

Que Dña. Norelia Rosa Torrealba Abache, ha realizado la Tesis Doctoral titulada
**“RUTAS DE TRANSDUCCIÓN CELULAR MEDIADAS POR ERK
EN PRÓSTATA NORMAL Y PATOLÓGICA”**, dirigida por Dña. María del
Mar Royuela García y D. Benito Fraile Láiz, en dicho Departamento.

VºBº DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO



Fdo. D. Juan Soliveri de Carranza,



Dña. MARÍA DEL MAR ROYUELA GARCÍA y D. BENITO FRAÍLE LÁIZ,
Profesores Titulares del Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la
Universidad de Alcalá,

CERTIFICAN

Que **Dña. Norelia Rosa Torrealba Abache**, ha realizado bajo su dirección el trabajo correspondiente a la Tesis Doctoral, que lleva por título **“RUTAS DE TRANSDUCCIÓN CELULAR MEDIADAS POR ERK EN PRÓSTATA NORMAL Y PATOLÓGICA”**, cumpliéndose todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa y aprobación.

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Fdo. Dña. María del Mar Royuela García



Fdo. D. Benito Fraile Láiz

A Miguel Ángel García (Mi chiqui).

A mis hermanos César, Tibusay y Arelis.

A los que no están, papá, mamá, mi abuela Rosa
y mi madrina Morella.

**Lo que me contaron lo olvide,
lo vi y lo entendí, lo hice y lo aprendí.**

Confucio (China, h. 551-479 a. C.)

**La mente que se abre a una nueva idea,
jamás volverá a su tamaño original.**

Albert Einstein (Alemania, 1879-Estados Unidos, 1955)

**Los guerreros victoriosos primero ganan y después van a la guerra,
mientras que los guerreros vencidos primero van a la guerra
y después buscan ganar.**

Sun Tzu (China, 544-496 a. C)

Agradecimiento

Agradezco ante todo a Dios y al Universo por la oportunidad brindada.

A la Universidad Central de Venezuela, *la casa que vence las sombras*, y a la Universidad de Alcalá. Ambas patrimonio de la humanidad ¡Qué suerte he tenido!

Yo no escogí la Genética, fue ella quien me escogió.

Vine a España a hacer un Máster en Laboratorio Clínico, pero un buen día me vi favorecida por una beca de la Universidad de Alcalá para hacer el curso de Experto en Genética Clínica. Allí, las clases magistrales del Dr. José Miguel García Sagredo marcaron un antes y un después de mi gusto por la genética. Gracias, José Miguel por compartir tus conocimientos.

Como todo amor que nos invade, deseé conocer más de esta área y decidí hacer el Máster de Genética y Biología Celular en esta misma Universidad. Conté desde los inicios con la ayuda incondicional de la Dra. Esther Ferrer, quien sin conocerme me asesoró en todo lo relacionado con el Máster. Gracias Esther por tu paciencia y tus consejos. Ella fue la línea de contacto con la Dra. Mar Royuela, hoy mi tutora, claro en ese momento yo no lo sabía. Con este equipo de docentes e investigadores hice el trabajo de fin de Máster. Al concluir el Máster me quedé para hacer el Doctorado.

Al inicio de mi tesis tuve el oportuno apoyo de Gonzalo Rodríguez-Berriguete, hoy Doctor. Gracias Gonzalo por lo que me enseñaste y por los momentos compartidos. Y si de momentos compartidos se trata tengo que agradecer a Rebeca Santana, hoy debe estar disfrutando de su vida profesional. Fue mi primera compañera en este laboratorio, no sabes lo que te extrañé cuando te fuiste de Erasmus. Siempre estarás en mis pensamientos y mi corazón te deseará siempre lo mejor.

Mar no solo ha sido mi tutora, también he contado con su amistad, siendo paño de lágrimas en momentos difíciles y también con quién he celebrado logros y alegrías compartidas. Con ella aprendí el significado de la palabra investigación y todo lo que esto involucra. Me faltan palabras que encierren todo lo que te agradezco, tu paciencia y confianza en mí. Ha sido un largo camino, con subidas y bajadas, con aprendizajes no solo de laboratorio e investigación...

Benito, mi otro tutor. Gracias por tu disposición sin límites para ayudarme, por tus sabias orientaciones que han contribuido con mi formación tanto académica como personal.

Agradezco a los Doctores Ángeles Redondo y Nicolás Jouve por brindarme la oportunidad de asistir al VIII Seminario de Citogenética, experiencia enriquecedora. Que me permitió conocer a los demás miembros del Departamento y a otros chicos que realizaban el Doctorado en diversos temas relacionados con la citogenética en otras Universidades de España. A los profes Yolanda y Miguel Rubio por poner su granito de arena en la revisión de la tesis. Gracias.

A Ángeles y Alfredo, con quienes cada día le hacíamos honor al origen de la palabra *comer*, que dice que “se debe hacer siempre acompañado”, y a la palabra *compañero* que deriva de

“compartir el pan” ¡Menuda forma de hacerle honor!. Fueron comidas acompañadas de buenas conversaciones, consejos y muestras de apoyo. En especial a Ángeles, mi vecina de despacho, por estar pendiente de mí. Por tu alegría contagiosa, por entender mis miradas de S.O.S. e inyectarme ánimo a diario.

A Consuelo Martínez López, nuestra querida Chelo, secretaria del Departamento, quien todo lo soluciona sin nunca perder su bella sonrisa. Gracias Chelo. Y a su hija Sonia (Luna) que supo plasmar mis indicaciones en las ilustraciones de esta tesis. Gracias, Sonia.

A Conchi, por amenizar los desayunos y por tu ayuda cuando necesitaba manos para terminar las IHQ.

Lo mejor de la ciencia es el trabajo en equipo y vaya equipo que hice con Nacho, Isabel, África, Laura T, Miguel Ángel, Laura P, Esther y Marcos quienes a pesar de sus cortas estancias en el laboratorio hacían de cada momento una experiencia enriquecedora.

A Miguel Ángel con quién compartí laboratorio por dos años. Gracias por tu amistad, por compartir tus sueños y esperanzas. En mis oraciones estás presente pidiéndole a Dios que te ayude a cumplir tus metas.

A los que están lejos:

A mis amigas, esas de toda la vida. Las que siempre me animaron a seguir este camino que emprendí. Siempre estaban ahí a pesar de la distancia. Marión, Thais, Miriam, María Teresa, Mari M, Ylba, Yolanda U, Gisela, Yolanda P, Rosa, Dedit, por siempre, gracias.

A Rita Pérez, siempre mi jefa, siempre mi amiga. Nunca entendiste por qué cambié de rumbo. Espero que algún día me perdones por dejar mi trabajo y por no compartir tus ideales. Tus lecciones siempre están conmigo y me han ayudado mucho. Gracias Rita, te quiero a pesar de nuestras diferencias.

A mi madrina: Miriam. A mis primis Hegly, Óscar, Claudia, Hayrim Morella, Marisela, Alfredo y a mi cuñis Marianella.

Al amor incondicional de mi familia, donde nací y crecí. A mi padre y a mi madre quienes estarán celebrando muy orgullosos los logros de su hija menor, donde quiera que estén. A mis hermanos: César, Tibisay, Arelis Germán y Victoria apoyo incondicional día a día desde la distancia. A mi sobrina Ghesiree, mi gemela, compañía permanente a pesar de los kilómetros que nos separan. A su bebe Matías. A Danny, su esposo, siempre pendiente. A Sonia, Karina y a sus críos Tatiana, Rodrigo, Ignacio. A todos, gracias infinitas.

A mis amigas guerreras, por su lucha y constancia, que no se rinden y tampoco permitieron que yo me rindiera Elizabeth, Luisa Elena, Nathaly, Yajaira, Yoleida, Cristina, Mirkalis, Mariana. ¡Qué tías! Gracias chicas por ser un ejemplo a seguir.

A Cioly, mi amiga que llegó a España cuando más la necesitaba. Gracias Cioly por esos días compartidos, quitándote tus horas de descanso para ayudarme y guiarme en esta etapa final de mi tesis. No tengo como pagarte y agradecerte toda tu paciencia y enseñanzas. TQM.

A Maribel y Carlos que pertenecen a mi familia española. Gracias por todo el apoyo. Por haberme recibido en su familia abriendo las puertas de sus casas y de sus corazones. Son los mejores. Los quiero mucho.

A Miguel. El origen de todo. De la idea de dejar mi país y comenzar de nuevo. Gracias por tu amor, por tu apoyo. Por creer en mí, decirme que si podía, cuando yo pensaba que era imposible. Este Doctorado también es tuyo, ya que lo has vivido de principio a fin.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto PI13/01801 del Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España).

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	9
I Introducción	15
1. Próstata humana.....	17
1.1 Embriología.....	17
1.2 Anatomía.....	19
1.3 Histología.....	21
1.4 Fisiología y regulación hormonal.....	23
1.4.1 Regulación androgénica de las interacciones entre estroma y epitelio....	24
2. Patologías de la próstata.....	26
2.1 Hiperplasia benigna de próstata (HBP).....	26
2.2 Neoplasia intraepitelial prostática (PIN).....	26
2.3 Inflamación prostática.....	27
2.4 Cáncer de próstata.....	27
2.4.1 Desarrollo de la patología prostática.....	27
2.4.2 Detección y diagnóstico.....	29
a) Indicaciones de la biopsia de próstata.....	30
b) Sistema TNM (Tumor Nódulo Metástasis).....	30
2.4.3 Factores pronósticos del cáncer de próstata.....	32
a) Puntuación Gleason.....	32
b) PSA sérico.....	34
c) Extensión extraprostática.....	34
d) Estatus del margen quirúrgico.....	34
e) Metástasis en nódulos linfáticos.....	35
f) Invasión perineural.....	35
g) Invasión de vesícula seminal.....	35
3. Homeostasis: Ciclo celular, Apoptosis e Inflamación.....	35
3.1 Ciclo celular.....	35
3.2 Apoptosis.....	39
3.2.1 La familia Bcl-2.....	40
3.2.2 Proteínas inhibidoras de la apoptosis.....	41
3.3 Inflamación.....	44
3.3.1 La familia de interleuquina 1 (IL-1).....	44
3.3.2 TNF- α	45
3.3.3 IL-6.....	45
3.3.4 Factores de crecimiento epidérmico (EGF).....	46
3.3.5 Factor de crecimiento transformante (TGF-B).....	46
3.3.6 La familia de las MAPKs.....	48
a) Proteínas MEK.....	48
b) ERK.....	50
c) p38 MAPK.....	50
4 Cáncer de próstata resistente a castración.....	51
5 Rutas de señalización involucradas en el cáncer de próstata.....	52
5.1 Vía de transducción NF- κ B/ATF/AP-1/Elk-1.....	52

5.2 Vía de EGF/IL-6.....	56
5.3 Vía de transducción PI3K/Akt/mTOR.....	57
6 Hipótesis y objetivos.....	54
HIPÓTESIS DE PARTIDA.....	60
OBJETIVOS.....	60
II Materiales y Métodos.....	63
Estudio <i>in vivo</i>	65
1 Materiales.....	65
1.1 Muestras.....	65
1.2 Anticuerpos.....	66
Anticuerpos primarios empleados.....	66
Anticuerpos secundarios empleados.....	67
2 Métodos.....	68
2.1 Fijación e inclusión del tejido prostático humano.....	68
2.2 Extracción de proteínas de tejido prostático humano.....	68
2.3 Inmunohistoquímica (IHQ).....	68
2.4 Western Blot.....	71
2.4.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976)... a) Electroforesis en gel del poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)..... b) Transferencia..... c) Inmunodetección..... Reactivos..... Geles de poliacrilamida.....	71 71 72 72 73 73
2.5 Densitometría óptica.....	74
2.5.1 <i>Western Blot</i>	74
2.5.2 Inmunohistoquímica.....	74
2.5.3 Evaluación y puntuación del inmunomarcaje.....	74
2.6 Análisis estadístico.....	74
a) Características clínico-patológicas estudiadas.....	75
b) Estadísticas descriptivas.....	75
c) Correlación de Spearman.....	76
d) Análisis de supervivencia: definición del tiempo de seguimiento, curvas de Kaplan-Meier, <i>log-rank</i> y modelo de riesgo proporcionales de Cox.....	76
Estudio <i>in vitro</i>	77
3 Materiales.....	77
3.1 Líneas celulares.....	77
3.2 Citoquinas e inhibidores químicos.....	77
4 Métodos.....	78
4.1 Mantenimiento y tratamiento de los cultivos celulares.....	78
4.2 Ensayo del MTT.....	78
4.3 Determinación de muerte celular y apoptosis/distribución del ciclo celular... 4.3.1 Determinación de muerte celular (ensayo de viabilidad)..... 4.3.2 Determinación de apoptosis/distribución de las fases del ciclo celular....	79 79 80
III Resultados.....	81

1 Estudio comparativo de la expresión de la vía de transducción IL-1a/p38/NF-kB/ATF/ AP-1/Elk-1 en el estroma y tumor en próstata normal y patológica.....	83
1.1 Análisis por Western Blot de la vía de transducción IL-1a/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 en próstata normal, HBP y cáncer de próstata.....	83
1.2 Análisis de la expresión de la vía de transducción IL-1a/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 mediante inmunohistoquímica en próstata normal, HBP y cáncer de próstata.....	83
1.2.1 Activación IL-1a y sus receptores.....	83
1.2.2 Activación MEK-6/p38.....	86
1.2.3 Activación de los factores de transducción celular.....	87
1.2.4 Activación familia Bcl-2 y mp53.....	89
1.3 Proporción de pacientes con inmunotinción positiva para la vía de transducción IL-1a/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 en el estroma y tumor en la cohorte estudiada.....	93
1.4 Correlación entre la expresión en el estroma y tumor en los componentes de la vía de transducción IL-1a/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 y las características clínico-patológicas de cáncer de próstata.....	93
1.4.1 Correlación entre la expresión de la inmunohistoquímica en el estroma y los marcadores clásicos.....	93
1.4.2 Correlación entre la expresión de la inmunohistoquímica en el tumor y los marcadores clásicos.....	94
1.4.3 Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el estroma y los marcadores clásicos.....	95
1.4.4 Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el tumor y los marcadores clásicos.....	96
1.5 Correlación de la expresión de la vía de transducción IL-1a/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 y tiempo de recurrencia bioquímica (análisis de supervivencia).....	98
2. Estudio comparativo de la expresión de la vía de EGF/IL-6/MEK/ERK en el estroma y tumor en próstata normal y patológica.....	101
2.1 Análisis por <i>Western Blot</i> de la vía de EGF/IL-6/MEK/ERK en próstata normal, HBP y cáncer de próstata.....	101
2.2 Análisis de la expresión de la vía EFG/IL-6/MEK/ERK en próstata normal, HBP y cáncer de próstata.....	101
2.2.1 Activación EGF y su receptor.....	101
2.2.2 Activación IL-6 y gp-130.....	102
2.2.3 Activación Raf-1/Rb.....	104
2.2.4 Activación MEK-1/ERK.....	105
2.2.5 Activación c-myc.....	108
2.2.6 Activación IAP.....	119
2.3 Proporción de pacientes con inmunotinción positiva para la vía de transducción EGF/IL-6/MEK/ERK en el estroma y tumor en la cohorte estudiada.....	111
2.4 Correlación entre la expresión en el estroma y tumor de los componentes de la vía de transducción EGF/IL-6/MEK/ERK con las características clínico-patológicas en cáncer de próstata.....	111

2.4.1	Correlación entre la expresión de la inmunohistoquímica en el estroma y los marcadores clásicos.....	111
2.4.2	Correlación entre la expresión de la inmunohistoquímica en el tumor y los marcadores clásicos.....	112
2.4.3	Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el estroma y los marcadores clásicos.....	113
2.4.4	Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el tumor y los marcadores clásicos.....	114
2.5	Correlación de la expresión de la vía EGF/IL-6/MEK/ERK con el tiempo de recurrencia bioquímica (análisis de supervivencia).....	116
3.	Estudio comparativo de la expresión de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt en el estroma y tumor en la próstata normal y patológica.....	117
3.1	Análisis por <i>Western Blot</i> de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt en próstata normal, HBP y cáncer de próstata.....	117
3.2	Análisis de la expresión de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt en próstata normal, HBP y cáncer de próstata.....	117
3.2.1	Activación TGF-B y sus receptores.....	117
3.2.2	Activación PI3K/Akt.....	119
3.2.3	Activación Ikk/IkB.....	122
3.2.4	Activación mTOR.....	124
3.2.5	Activación p21 y p27.....	125
3.3	Proporción de pacientes con inmunotinción positiva para la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt en el estroma y tumor en la cohorte estudiada.....	127
3.4	Correlación en la expresión en el estroma y tumor de los componentes de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt con las características clínico-patológicas en cáncer próstata.....	127
3.4.1	Correlación entre la expresión de la inmunohistoquímica en el estroma y los marcadores clásicos.....	127
3.4.2	Correlación entre la expresión de la inmunohistoquímica en el tumor y los marcadores clásicos.....	128
3.4.3	Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el estroma y los marcadores clásicos.....	129
3.4.4	Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el tumor y los marcadores clásicos.....	130
3.5	Correlación de la expresión de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt con el tiempo de recurrencia bioquímica (análisis de supervivencia).....	132
3.6	Significado clínico de la expresión de las rutas de transducción en el estroma y tumor en cáncer de próstata.....	135
3.6.1	Análisis de frecuencia de los parámetros clínicos.....	135
3.6.2	Valor pronóstico de los marcadores de los marcadores clásicos para recurrencia bioquímica en la cohorte estudiada.....	135
3.7	Valor pronóstico para recurrencia bioquímica de los componentes de las rutas de transducción estudiadas en asociación con marcadores clásicos.....	137
Vía de transducción IL-1a/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1.....		137
Vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt.....		139
4	Cultivos celulares.....	141
A.	TGF-B.....	141

1 Efecto de TGF-B en el tamaño de la población celular.....	141
2 Inducción de proliferación de TGF-B.....	141
3 Efecto de la inhibición de p38 en la proliferación por TGF-B.....	142
4 Inducción de p38 en la proliferación por TGF-B.....	143
5 Efecto de la inhibición de ERK en la proliferación mediada por TGF-B.....	144
6 Inducción de ERK en la proliferación mediada por TGF-B.....	145
B. EGF.....	146
1 Efecto de EGF en el tamaño de la población celular.....	146
2 Efecto de la privación de andrógenos y EGF sobre la muerte celular.....	146
3 Efecto de la privación de andrógenos y tratamiento EGF sobre la distribución del ciclo celular de células de LNCaP.....	147
4 Efecto de la inhibición de la p38 MAPK, MEK e Ikk-B en la proliferación inducida por EGF de las células LNCaP en condiciones de privación de andrógenos.....	148
5 Efecto de la inhibición de p38 MAPK y la estimulación de EGF en la fosforilación de Rb y la distribución del ciclo celular de las células LNCaP en condición de privación de andrógenos.....	149
IV Discusión.....	151
1 Expresión proteica de los componentes de la vía de transducción IL-1a/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 y su implicación en la próstata normal y patológica.....	153
1.1 Expresión de IL-1 y sus receptores.....	153
1.2 Expresión de MAPKs.....	154
1.3 Expresión de los factores de transducción celular.....	155
1.4 Expresión de la familia Bcl-2.....	158
2 Expresión proteica de los componentes de la vía de EGF/IL-6/MEK/ERK y su implicación en la próstata normal y la patología prostática.....	161
2.1 Expresión de EGF y su receptor.....	161
2.2 Expresión de IL-6/gp130.....	163
2.3 Expresión de Raf-1, MEK y ERK.....	164
2.4 Expresión de c-myc.....	166
2.5 Expresión de pRb, mp53 y Ki67.....	168
2.6 Expresión de IAPs.....	170
3 Expresión proteica de los componentes de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt y su implicación en la próstata normal y la patología prostática.....	170
3.1 Expresión de TGF-B y sus receptores.....	170
3.2 Expresión de PI3K/Akt/mTOR.....	172
3.6 Expresión de Ikk/IkB.....	174
3.9 Expresión de p21/p27.....	175
4 Capacidad pronóstica para recurrencia bioquímica, de los componentes de la ruta de transducción estudiadas en asociación con los marcadores clásicos.....	177
4.1 IL-1a y la ILRa como marcador pronóstico de recidiva bioquímica.....	177
4.2 p38 como marcador pronóstico de recidiva bioquímica.....	177
4.3 TGF-B como marcador pronóstico de recidiva bioquímica.....	178

4.4 PI3K como marcador pronóstico de recidiva bioquímica.....	178
V Conclusiones	179
VI Bibliografía	183
ANEXO I: Publicaciones	239
ANEXO II: Revisiones	

Abreviaturas

ABC	<i>Avidin biotin complex</i>	Complejo avidina botina
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>	Hormona adrenocorticotrófica
ADT	<i>Androgen deprivation therapy</i>	Terapia de privación de andrógenos
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>	Comité de la Junta Americana en Cancer
Akt	<i>Protein kinase B</i>	Proteína quinasa B
AP-1	<i>Activator protein 1</i>	Proteína activadora 1
APAF-1	<i>Apoptosis inducing factor</i>	
ASK1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>	Quinasa reguladora de señal de apoptosis 1
ATF	<i>Activating transcription factor</i>	Factores activadores de la transcripción
Bad	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>	
Bak	<i>Bcl-2 Antagonist killer 1</i>	
Bax	<i>Bcl-2 Associated X protein</i>	
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>	Proteína de linfoma de célula B 2
Bcl-xL	<i>Bcl-2L1 long isoform</i>	
Bim	<i>Bcl-2 Interacting mediator of cell death</i>	
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	Albúmina de suero bovino
BRUCE	<i>Baculoviral IAP repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme</i>	Enzima con BIR conjugadora de ubiquitina
b-ZIP	<i>Basic Leucine Zipper Domain</i>	
Caspasas	<i>Cysteine-dependent aspartyl-specific protease</i>	
CDKs	<i>Cyclin-depedent kinasas</i>	Quinasas dependientes de ciclinas
CDKI	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor protein</i>	Proteínas inhibidoras de las quinasas
cIAP1	<i>Cellular IAP</i>	IAP celular
CIP/KIP	<i>CDK interacting protein/kinase inhibitor protein</i>	Proteínas de interacción con CDK/Proteínas inhibidoras de quinasas
CP		Cáncer de próstata
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>	Elemento viculante de respuesta vinculante a AMPc
CREBBP	<i>CREB binding protein</i>	Proteína de unión a CREB
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>	Factor de crecimiento de tejido conectivo
DISC	<i>Death-inducing signalling complex</i>	Complejo de señalización inductor de muerte

DHT	<i>Dihydrotestosterone</i>	Dihidrotestosterona
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>	Dimetil Sulfóxido
D.O.	<i>Optical Density</i>	Densidad óptica
EDR	<i>Rectal digital examination</i>	Examen digito rectal
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	ácido etilendiaminotetraacético
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	Factor de crecimiento epidérmico
Elk-1	<i>ETS(E twenty-six)-like 1</i>	
EMT	<i>Epithelial mesenchymal transition</i>	Transición epitelio mesénquima
ErbB	<i>Erythroblastic leukemia viral oncogene</i>	
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>	Proteín quinasa regulada por señal extracelular
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>	Dominio de muerte asociado a Fas
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>	Suero fetal bovino
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>	Hormona liberadora de gonadotropinas
Gp-130		Glicoproteína 130
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>	
GSK3		Glucógeno sintasa 3β
Gsp-π	<i>Glutathione-S-Transferase-π</i>	
HBP	<i>Benig prostate hyperplasia</i>	Hiperplasia benigna prostática
HL	<i>Luteinizing hormone</i>	Hormona luteinizante
HLA-I	<i>Human leukocyte antigen</i>	Antígenos leucocitarios humanos
HLH	<i>Propeller-loop-propeller</i>	Hélice-lazo-hélice
HM	<i>Hydrophobic motif</i>	Motivo hidrófobo
IHQ	<i>Immunohistochemistry</i>	Inmunohistoquímica
IAPs	<i>Inhibitors of apoptosis proteins</i>	Proteína inhibidora de apoptosis
IC	<i>Confidence interval</i>	Intervalo de confianza
IκB	<i>Inhibitor of NF-κB</i>	Inhibidor de NF-κB
Ikk	<i>IκB kinase</i>	Quinasa de IκB
IL-1	<i>Interleukin-1</i>	Interleuquina-1
IL-6	<i>Interleukin-6</i>	Interleuquina-6
IL-6Rα	<i>IL-6 receptor α</i>	Receptor α de la IL-6
ILP2	<i>IAP-like protein 2</i>	

IP		Ioduro de propidio
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>	Sociedad Internacional de Patología Urológica
JNK	<i>c-Jun NH2-terminal kinase</i>	Quinasa N2 terminal de c-Jun
LH	<i>Luteinizing hormone</i>	Hormona luteinizante
LHRH	<i>luteinizing hormone-releasing hormone</i>	Hormona liberadora de hormona luteinizante
MAC	<i>Cell adhesion molecules</i>	Moléculas de adhesión celular
MKP-1	<i>kinase phosphatase 1</i>	
MAPKs	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MAPKK (MKK)	<i>MAPK kinase</i>	Quinasa de MAPK
MAPKKK	<i>MAPKK kinase</i>	Quinasa de MAPKK
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia-1 Bcl-2L3</i>	
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i>	Quinasa de MAPK/ERK
MOMP	<i>Major outer membrane protein</i>	Membrana externa mitocondrial
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>	Diana de rapamicina en células de mamífero
MTORC1	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>	
MTORC2	<i>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>	
MTT	<i>Methyl thiazol tetrazolium</i>	Metil tiazol tetrazolio
NAIP	<i>Neuronal apoptosis inhibitory protein</i>	Proteína inhibidora de la apoptosis neuronal
NDS	<i>Normal donkey serum</i>	Suero de burro normal
NES	<i>Nuclear export signals</i>	Secuencia de exportación nuclear
NF-kB	<i>Nuclear factor-kB</i>	Factor nuclear-kB
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>	Señal de localización nuclear
NP-40	<i>nonidet P-40</i>	Nonidet P-40
OMM	<i>External mitochondrial membrane</i>	Membrana mitocondrial externa
OMS	<i>World Health Organization</i>	Organización Mundial de la Salud
PAGE	<i>Poyacrylamide gel electrophoresis</i>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAP	<i>Prostatic acid posphatase</i>	Fosfatasa ácida prostática
PBS	<i>Phosphate buffered salina</i>	Tampón salino fosfato
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	Antígeno nuclear de células en proliferación
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Reacción de la cadena de polimerasa

PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>	Fosfatidilinositol 3 quinasa
PIN	<i>Prostatic intraepithelial neoplasia</i>	Neoplasia prostática intraepitelial
PIP2	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>	Fosfatidil inositol 3,4 difosfato
PIP3	<i>phosphatidylinositol [3,4,5] tris-phosphate</i>	Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato
PKC ϵ		Isoforma épsilon de la proteína quinasa
PKA	<i>Activation of protein kinase A</i>	Proteína quinasa A
Pm	<i>Molecular weight</i>	Peso molecular
PMSF	<i>Phenylmethane sulfonyl fluoride</i>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PN	<i>Normal prostate</i>	Próstata normal
PSA	<i>Prostate-specific antigen</i>	Antígeno específico de próstata
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i>	Homólogo de fosfatasa y tensina
PUMA	<i>p53 Up-regulated mediator of apoptosis</i>	
r	<i>correlation coefficient</i>	Coefficiente de correlación
RA	<i>Androgen receptor</i>	Receptor de andrógenos
Raptor	<i>regulatory-associated protein of mTOR</i>	
Rb	<i>Retinoblastoma tumor suppressor protein</i>	Proteína de susceptibilidad al retinoblastoma
RC	<i>Resistance to castration</i>	Resistencia a castración
RHD	<i>Rel homology domain</i>	Dominio homología Rel
Rictor	<i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>	
RR	<i>hazard ratio</i>	Razón de riesgos
RTKs	<i>Receptor tyrosine kinases</i>	Receptor tirosin quinasa
RTUP	<i>Résection trans-urétral de la prostate</i>	Resección transuretral prostática
SMAC/DIABLO	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pl</i>	Segundo activador de Icaspasa derivado de mitochondria/proteína de unión directa a IAP con pl bajo
SAPK	<i>Stress-activated protein kinases</i>	
SOS	<i>Son of sevenless</i>	
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription-3</i>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
STUI	<i>Lower Urinary Tract Symptoms</i>	Síntomas del tracto urinario inferior
S6K1	<i>Ribosomal protein S6 kinase beta-1</i>	

TBS	<i>Tris-buffered saline</i>	Tampón tris salino
TGF-B	<i>Transforming growth factor beta</i>	Factor de crecimiento transformante
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>	Factor de necrosis tumoral
TNFR1	<i>Tumour necrosis factor type-I receptor</i>	Receptor de TNF
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
T-TBS	<i>Tween-TBS</i>	Tween-TBS
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>	Factor de crecimiento vascular endotelial
WB	<i>Western Blot</i>	
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>	Proteína inhibidora de apoptosis ligada a X

Resumen

El cáncer de próstata es uno de los cánceres más comunes en la población masculina, afecta uno de cada seis hombres. En la actualidad se está utilizando las mediciones seriadas de PSA, el examen digito rectal (EDR) y la repetición de las biopsias de próstata para la estratificación del riesgo de los hombres en las primeras etapas del cáncer de próstata. A pesar que estas herramientas tienen algún valor predictivo, una fracción sustancial de los hombres que se espera que tengan enfermedad de bajo riesgo se encontró que tiene una enfermedad más agresiva en la prostatectomía. Quizás esto se deba en parte a la heterogeneidad tumoral prostática, lo que limita la utilidad de las biopsias previas a la prostatectomía.

El antígeno prostático específico (PSA) ha sido el marcador tumoral más utilizado. Sin embargo, el PSA no es específico de la enfermedad a pesar de ser considerado un marcador tumoral efectivo y órgano-específico. El seguimiento de las concentraciones del PSA no pronostica el comportamiento ni la agresividad del tumor.

En la búsqueda de un marcador bioquímico más específico, los estudios se dirigen a explorar factores que potencialmente participen en la señalización celular y que puedan convertirse en una herramienta útil en el diagnóstico temprano del cáncer de próstata o su recurrencia.

En tal sentido, en este trabajo se estudia la expresión de las proteínas que forman parte de las vías implicadas en los procesos de homeostasis, apoptosis e inflamación en próstatas normales y patológicas. Por métodos inmunohistoquímicos se ha evaluado la expresión de las proteínas y citoquinas de interés. Una vez conocida la expresión se determinó su asociación con las características clínico-patológicas y su importancia en el pronóstico de la progresión bioquímica en el cáncer de próstata. Se utilizó la prueba de Spearman para

correlacionar la expresión de las proteínas y citoquinas con las características clínico-patológicas en el cáncer de próstata. El valor pronóstico para recurrencia bioquímica tras prostatectomía radical fue determinado mediante análisis de supervivencia, utilizando el método de Kaplan-Meier, el *log-rank*, y la regresión de riesgos proporcionales de Cox unifactorial y multifactorial.

Las citoquinas pro-inflamatorias (IL-1a, TNF-a e IL-6) y anti-inflamatorias (EGF y TGF-B) activan importantes rutas de transducción de supervivencia celular. Como podría ser la activación de NF-kB p50, p-ATF-2, p-Elk-1, AP-1 que parecen estar estrechamente relacionados con la malignidad.

Algunos miembros de la familia como MAPKs (ERK-1, ERK-2, p-ERK y p38), MAPKKs (MEK-1, p-MEK y MEK-6) y MAPKKK (Raf-1) se encuentran sobreexpresadas en los tumores prostáticos lo cual nos sugiere que podrían estar involucradas en la patología prostática.

En las células cancerosas prostáticas los cambios de expresión de IL-1a, p38, TGF-B y PI3K podrían asociarse con pronóstico adverso y ser útiles como marcadores pronósticos independientes y complementarios para recurrencia bioquímica tras prostatectomía radical.

En esta investigación se estudió el efecto de EGF y TGF-B en las poblaciones celulares LNCaP (sensible a los andrógenos) y PC3 (independiente a andrógenos). EGF y su receptor tienen una acción determinante en el desarrollo de la patología prostática. EGF contribuye a la aparición de células resistente a castración a pesar de los bajos niveles de andrógenos circulantes debido a las terapias de privación de andrógenos. Además, podrían estar asociados con la malignidad. EGF podría actuar de manera similar a los andrógenos en las

células de cáncer de próstata, actuando sobre la fase G_0/G_1 . Este suceso podría provocar una transición hacia la fase S y en consecuencia, producir proliferación celular.

TGF-B actúa como supresor tumoral en el epitelio normal, sin embargo, en la carcinogénesis la señalización de TGF-B promueve el crecimiento y la división de la célula.

Confirmamos que TGF-B tiene un efecto proliferativo en las líneas células LNCaP y PC-3.

Este efecto es inhibido por p38 MAPK en las células LNCaP no así en las PC3. p38 MAPK podría ser un buen inhibidor de proliferación celular y debería tenerse en cuenta en el diseño de un posible tratamiento frente al cáncer de próstata.

Introducción

1 Próstata humana

1.1 Embriología

La próstata es una glándula exocrina que forma parte del sistema reproductor masculino de mamíferos. Segrega un fluido ligeramente alcalino que forma parte del líquido seminal. La organogénesis de la glándula prostática es dependiente de andrógenos e involucra eventos de señalización entre el epitelio y mesénquima del seno urogenital que en su parte posterior sufre invaginaciones que en definitiva, es donde se desarrollará la glándula.

En las primeras semanas de gestación el sistema urogenital pasa por un periodo en el que las gónadas están indiferenciadas. Los conductos mesonéfricos de Wolf y paramesonéfricos de Müller y sus desembocaduras en el seno urogenital serán los precursores de los órganos genitales internos. Las gónadas son las primeras estructuras en someterse a la diferenciación sexual y el seno urogenital la última (Cunhan, 1994; Marker y cols., 2003).

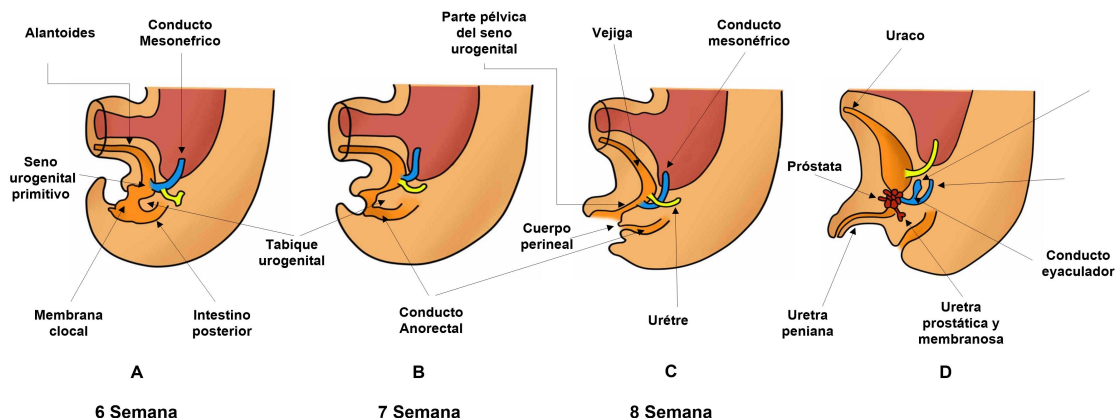


Figura 1. Formación del sexo masculino. Divisiones de la cloaca en el seno urogenital entre la 6ª y 8ª semana. La próstata está formada por yemas procedentes de la uretra y las vesículas seminales están formadas por gemación del conducto deferente. Tomado de Langma 13ª edición, Saldler, 2014.

De la cuarta a la séptima semana de desarrollo, la cloaca se divide anteriormente en seno urogenital y posteriormente en conducto anal (Figura 1A, 1B). El tabique urorectal es una capa de mesodermo entre el conducto anal primitivo y el seno urogenital. La punta del tabique formará el cuerpo perineal (Figura 1C). El seno urogenital puede diferenciarse en tres partes la parte superior y más grande que es la vejiga urinaria; un conducto más bien estrecho, que se corresponde con la parte pélvica del seno urogenital (Figura 1C) y que en

el sexo masculino originará tanto la parte prostática como la membranosa de la uretra; y la parte fállica del seno urogenital (Sadler, 2012).

La parte más cefálica del seno urogenital primitivo, situada por encima de los conductos mesonéfricos de Wolf, se transforman en el canal vesicouretral, de donde derivará la vejiga urinaria y la porción proximal de la uretra. Al final del tercer mes, el epitelio de la uretra prostática empieza a proliferar y forma numerosas excrecencias que se introducen en el mesénquima circundante. En el sexo masculino, las yemas forman la próstata (Figura 1D) (McNeal, 1972; Sadler, 2012). Todos estos brotes uretrales se fusionarán para constituir un órgano glandular muscular que adquirirá una cápsula externa formada por la condensación del tejido fibromuscular. La posición, el número y la proliferación de los brotes de la glándula prostática varían considerablemente entre individuos.

El desarrollo de la próstata es un proceso dinámico en el que los mecanismos básicos de la excrescencia epitelial y la interacción epitelio-mesénquima son iniciadas por los andrógenos y la señalización de receptores de andrógenos.

Las células del epitelio glandular y las células mesenquimatosas del estroma convierten la testosterona en dihidrotestosterona (DHT) por acción de la enzima 5 α -reductasa (Moore y Wilson, 1973; Schweikert y cols., 1985). La DHT actúa en el desarrollo prostático a través de las células mesenquimáticas del estroma induciendo la síntesis y secreción de distintos factores de crecimiento. El mecanismo íntimo de acción de la DHT en la embriogénesis de la próstata humana no es bien conocido. Actualmente se acepta que la acción de los andrógenos es esencial para el desarrollo prostático por la necesaria interacción mesénquima-epitelio (Cunha, 1972; Cunhan y Donjacour, 1987), interacción posiblemente mediada por distintos factores de crecimiento (Norman y cols., 1986; Cunha, 1994).

Al nacer, la mayoría de los acinos prostáticos están revestidos por epitelio que se caracteriza por una extensa metaplasia pavimentosa (Andrews, 1951). Se cree que la estimulación del desarrollo postnatal está bajo el control de esteroides maternos residuales tales como los estrógenos y sin embargo, hay una fase de involución prostática postnatal que se observa durante los primeros 5 meses de vida. En condiciones normales se producen grandes picos séricos transitorios de andrógenos, estrógenos y progesterona en etapas muy tempranas de la vida postnatal. Se observan picos neonatales de testosterona entre los dos a tres meses de edad. Las concentraciones de progesterona son altas al nacer y se cree que están elevadas debido a la producción placentaria de progesterona. Se produce un segundo pico transitorio de progesterona alrededor de los dos meses de edad (Forest, 1979).

La próstata del adulto joven pesa aproximadamente 20 g y es el más grande de los órganos reproductores adicionales masculinos. El tamaño de la próstata varía con la edad (Bosch y cols., 2007). En los hombres más jóvenes, la próstata es del tamaño aproximado de una

nuez. Sin embargo, puede ser mucho más grande en hombres de más edad (American Cancer Society, 2013).

La próstata alcanza su estructura y madurez funcional por lo general hacia la edad de 18 a 20 años y mantiene esta estructura durante aproximadamente 10 años, apareciendo alrededor de los 30 años signos iniciales de desintegración estructural y funcional. Durante este tiempo las células estromales y parenquimatosas de la glándula permanecen quiescentes, unos 15 a 20 años más tarde, se reanuda su actividad proliferativa, tras un cambio de ambiente hormonal (Aumüller y cols., 1994).

1.2 Anatomía

La próstata es una glándula con doble funcionalidad: uretral y sexual accesoria. Se encuentra por detrás de la porción inferior de la sínfisis del pubis y del plexo de Santorini y delante de la ampolla rectal. Se trata de una estructura globular que encapsula completamente la uretra prostática y los conductos eyaculadores (Figura 2). Tiene forma de cono invertido, con una base amplia (Drake y cols., 2010). La próstata es un órgano músculo-glandular, donde aproximadamente el 30% de su peso corresponde al componente muscular y el resto al componente glandular. A causa de la gran cantidad del músculo liso en el estroma, la glándula es relativamente firme (Welsch, 2014).

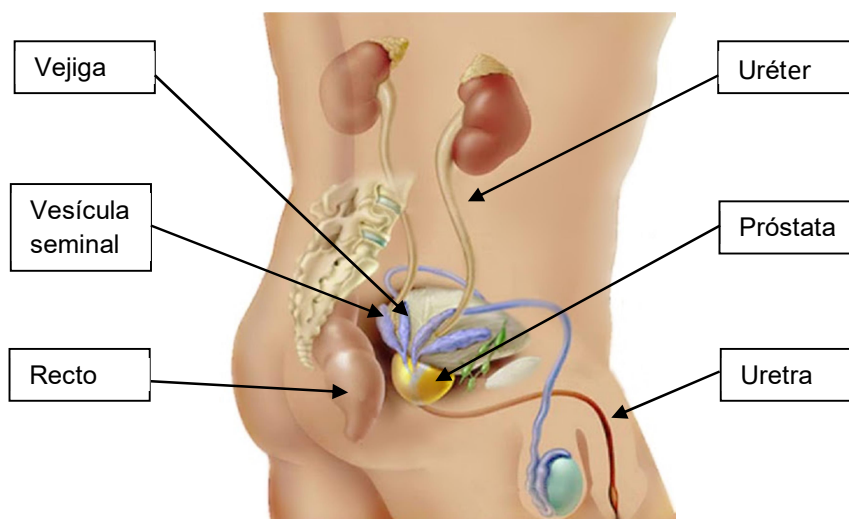


Figura 2. Localización de la próstata humana. Tomado de <http://www.liquidarea.com/2013/08/cancro-alla-prostata-scoperta-una-mutazione-genetica/>.

La próstata está compuesta por 30-50 glándulas tubuloalveolares que se disponen en tres capas concéntricas de tal modo que las glándulas de la capa mucosa interna son las encargadas de secretar directamente a la uretra, y las glándulas de la capa submucosa intermedia y de la capa periférica contienen las glándulas prostáticas principales que desembocan en los senos prostáticos (Welsch, 2014).

Para describir la anatomía de la próstata se han propuesto diferentes modelos que establecen, la relación entre la heterogeneidad histológica de la próstata y sus diversas patologías, como el modelo de Gil Vernet y el de McNeal (McNeal, 1981; Bostwick y Cheng, 2008). Este último modelo anatómico es el más utilizado por la relación que existe entre las distintas zonas de la próstata y las enfermedades prostáticas. Para la descripción de la próstata tomaremos el modelo anatómico zonal de McNeal.

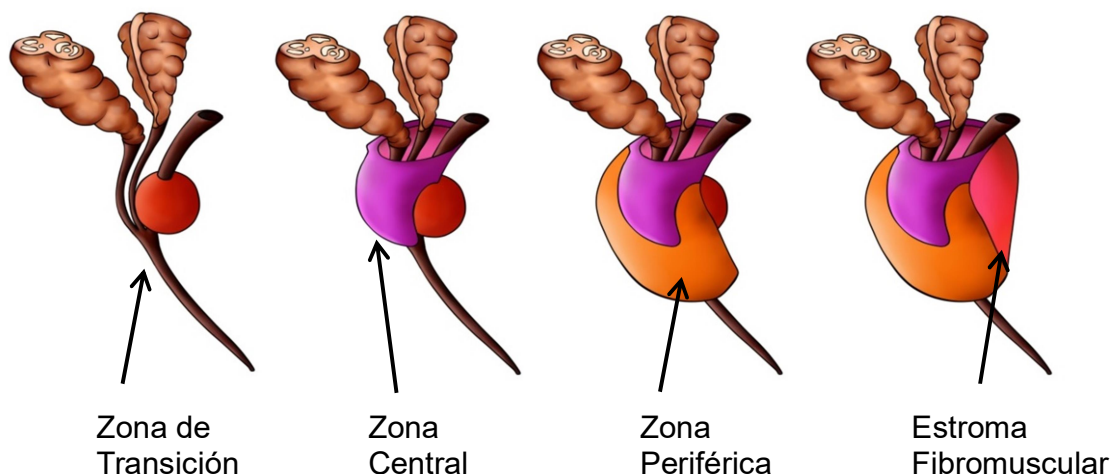


Figura 3. Distribución zonal según McNeal. Modificado de <http://cancer-prostata.euroresidentes.com/2014/08/zonas-de-la-prostata.html>.

El modelo anatómico de McNeal establece que en el adulto existe cuatro zonas biológicas, clínica y anatómicamente diferenciadas: zona periférica, zona central, zona de transición y región del estroma fibromuscular anterior (Figura 3). La zona periférica constituye el 70% del volumen prostático y es allí donde se encuentran las glándulas prostáticas principales. Es una zona susceptible a la inflamación y donde surgen la mayoría de los carcinomas. (McNeal, 1981). En la zona central, está la mayor parte del tejido glandular de la próstata y es una zona resistente a carcinomas y a la inflamación. Representa un 25% del volumen de la próstata. Por el contrario, en la zona transicional se origina la hiperplasia nodular (McNeal, 1981) y el 20% de los cánceres de próstata. Esta zona comprende el 5% del tejido glandular. El estroma fibromuscular ocupa aproximadamente un tercio de la próstata. Su porción distal es importante en las funciones voluntarias del esfínter, mientras que su porción proximal desempeña un papel central en las funciones voluntarias (Bostwick y Cheng, 2008; Robbins y Conran, 2010).

La zona de transición y la región periuretral son los únicos sitios de origen de la hiperplasia benigna de próstata (HBP), consistiendo en la mayoría de los casos en agrandamiento de la zona de transición. En la región periuretral rara vez alcanza masa significativa, excepto ocasionalmente como un nódulo de la línea media dorsal en el cuello de la vejiga, que

sobresale a la luz de la vejiga (Fibbi y cols., 2010; Timms y Hofkamp, 2011; Yoo y Cho, 2012).

1.3 Histología

Con la pubertad la próstata cambia su arquitectura, formándose conductos y glándulas ramificadas dispuestas en lóbulos y rodeada de estroma. La estructura histológica de la zona secretora y la excretora es idéntica, salvo en la porción ductal inmediata a la uretra, en la que se observa epitelio pseudoestratificado. Los conductos constituyen largas estructuras tubulares ramificadas en oposición a la forma redondeada de los acinos. La superficie luminal en las glándulas de la próstata tiene un contorno ondulado y fruncido.

La glándula prostática humana se divide en dos componentes: epitelio y estroma, separados por una membrana basal (Cunha, 2008). El compartimiento epitelial está compuesto de: células luminales secretoras, células basales, células neuroendocrinas y células madre (De Marzo y cols., 1998a). Por su arquitectura, el compartimiento del estroma tiene función de sostén estructural (De Marzo y cols., 1998a, 1998b) y consiste sobre todo en tejido conectivo, células musculares lisas y fibroblastos (Figura 4).

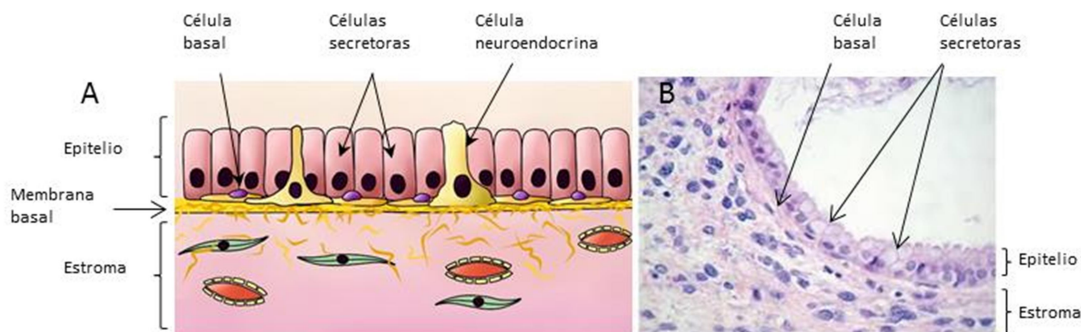


Figura 4. Histología prostática. A) Representación del epitelio prostático no patológico, donde se indican los tres tipos celulares que lo componen. B) Micrografía de una sección histológica de próstata normal teñida con hematoxilina-eosina donde se puede apreciar el epitelio y el estroma. Dentro del epitelio podemos observar células secretoras y algunas basales.

Las células luminales secretoras constituyen un 73% del volumen epitelial. Están separadas de la membrana basal y el estroma por una capa de células basales. Las células secretoras tienen forma cúbica a columnar alta, núcleo redondeado y pequeño, nucléolo poco visible o como un punto, cromatina finamente granular y citoplasma pálido. Se caracterizan por proyectarse hacia la luz de la glándula. Su capacidad proliferativa es la más baja de las células epiteliales prostáticas. Se caracterizan por expresar receptor de andrógenos (RA), marcador de superficie CD57 y citoqueratinas 8 y 18, pero carece de citoqueratinas 5 y 6, y de p63 (Nagle y cols., 1987; Bostwick y Cheng, 2008; Shen y Abate-Shen, 2010). Además, producen antígeno específico de próstata (PSA), fosfatasa ácida prostática (PAP), una serina de la proteasa responsable de la prevención de la coagulación del semen durante la

eyaculación y otros productos de secreción (Marker y cols., 2003; Bostwick y Cheng, 2008; Rybak y cols., 2015).

Las células basales son el segundo constituyente del epitelio prostático, paralelas a la membrana basal, formando una capa plana, continua y tenue, son marcadamente alargadas y aplanadas, con poco o ningún citoplasma perceptible con núcleos delgados, filiformes y oscuros. Este tipo celular posee la mayor actividad proliferativa del epitelio prostático dividiéndose normalmente y madurando a células secretoras. Expresan altos niveles de citoqueratinas 5 y 14, CD44 y p63. No expresan o expresan bajos niveles de PSA, PAP, RA (receptor de andrógenos) y citoqueratinas 8 y 18 (Nagle y cols., 1987; Verhagen y cols., 1988; Shen y Abate-Shen, 2010). En concordancia con su hipotética función como células *stem* o progenitoras, las células basales también expresan factores protectores frente al daño del DNA, como por ejemplo Gst- π o la proteína antiapoptótica Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein 2*) (Shen y Abate-Shen, 2010).

Las células neuroendocrinas constituyen el tercer y minoritario tipo celular. Estas células se hayan distribuidas al azar entre las secretoras y sobre la capa de las células basales pero típicamente no parecen extenderse a la luz, aunque puedan enviar una estrecha prolongación apical. No se identifican usualmente mediante tinciones hematoxilina-eosina. Se cree que proporcionan señales paracrinas a las células luminales para su crecimiento y proliferación (Abrahamsson, 1999). Su origen embrionario es incierto. Aunque algunos estudios apoyan que las células neuroendocrinas derivan de células que migran desde la cresta neural (Aumuller y cols., 1999), cada vez cobra más fuerza la idea de que se originan a partir del endodermo –como el resto de células epiteliales prostáticas– por analogía a poblaciones celulares similares de intestino y páncreas (Andrew y cols., 1998). Los marcadores inmunohistoquímicos más definitorios de las células neuroendocrinas son la serotonina y la cromogranina (Amorino y Parsons, 2004), pero también expresan PSA y RA (Aprikian y cols., 1993).

La presencia de células madre en el epitelio prostático adulto se deduce de la capacidad del epitelio de experimentar varios ciclos de regresión-regeneración tras privación-restablecimiento de los andrógenos y para producir una progenie madura sin perder su identidad o potencial funcional, asegurando así el mantenimiento de la población celular madre durante el crecimiento clonal (Chambers y Smith, 2004; Kreso y Dick, 2014). Por lo tanto, el epitelio prostático debe contener un reservorio de células madre resistentes a la privación androgénica (Shen y Abate-Shen, 2010). Parece haber múltiples poblaciones de células madre independientes (English y cols., 1987; Richardson y cols., 2004; Wang y cols., 2009).

La lámina basal forma una interfase con el compartimiento del estroma que proporciona sostén estructural a las células basales, las células madre y al epitelio secretor. El estroma fibromuscular está situado en el lado opuesto de la lámina basal. Este estroma se compone

de fibroblastos, células musculares lisas y una matriz extracelular rica en fibras de colágeno. Otras células claves en el compartimiento del estroma incluye células endoteliales, fibras nerviosas autónomas y ganglios asociados, y diversas células del sistema inmunológico (Wein y cols., 2015).

1.4 Fisiología y regulación hormonal

La próstata es una glándula prácticamente imperceptible y sin actividad secretora en los primeros años de vida. Es a partir de los 12 a 14 años cuando se produce un desarrollo importante de la misma con un incremento significativo del componente glandular.

La función principal de la próstata consiste en secretar un líquido de aspecto claro, ligeramente alcalino (pH 7.29) que contribuye a la composición del semen aportando prostaglandinas, espermina, potasio, fructosa, fosforilcolina, aminoácidos, ácido cítrico y zinc. Además, proporciona enzimas como esterasas, proteasas y fosfatasas. Estas secreciones prostáticas proporcionan nutrientes y un medio adecuado para la supervivencia de los espermatozoides mejorando su motilidad y alcalinizando el canal vaginal para promover mayor viabilidad (Hunter y Davis, 1997).

Se considera que la producción prostática de hormonas y enzimas no posee un papel determinante para el mantenimiento de la homeostasis glandular (Bostwick y Cheng, 2008; Wein y cols., 2015).

Al igual que otros tejidos sexuales accesorios, la próstata es estimulada en su crecimiento, mantenimiento y su función secretora por la presencia continua de ciertas hormonas y factores de crecimiento (Wein y cols., 2015). La principal hormona es la testosterona, sintetizada en las células de Leydig de los testículos a partir de la pregnenolona, a través de un conjunto de reacciones reversibles. Por acción de la 5 α -reductasa se convierte en el andrógeno más activo dihidrotestosterona (DHT) aunque mediante la aromatasa puede convertirse en estrógenos, siendo un proceso irreversible (Wein y cols., 2015).

El hipotálamo libera hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), también llamada hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). Ante la estimulación de la GnRH, la hipófisis libera hormona luteinizante (LH), que se transporta a los testículos y actúa directamente sobre las células de Leydig para estimular la síntesis de esteroides de *novo* y la liberación de testosterona, el principal andrógeno sérico del organismo, a partir de acetato y colesterol. La mayor parte del estrógeno en el varón deriva de la conversión periférica de andrógenos en estrógenos por aromatización. Los estrógenos exógenos bloquean la acción de los andrógenos, no en forma primaria por efectos directos sobre la próstata, sino en forma indirecta por bloqueo de la función hipofisaria. Los estrógenos producen retroalimentación negativa sobre la liberación de hormona luteinizante, que reduce la señal sérica para la producción de testosterona testicular (Wein y cols., 2015).

Además de la testosterona, las glándulas suprarrenales secretan andrógenos menores por la estimulación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH), por ejemplo, la androstenediona que también es convertida periféricamente en estrógenos. Tanto en los animales como en los seres humanos la castración conduce a la involución casi completa de la próstata, lo que señala que no hay cantidad suficiente de andrógeno suprarrenales para estimular cualquier crecimiento significativo de la próstata normal (Wein y cols., 2015).

En el varón humano normal, el principal andrógeno sérico circulante es la testosterona. En condiciones normales, las células de Leydig de los testículos son la principal fuente de los andrógenos testiculares. Si bien la testosterona es el principal andrógeno plasmático inductor del crecimiento de la glándula prostática y otros tejidos sexuales accesorios, parece funcionar como prohormona (Wein y cols., 2015).

1.4.1 Regulación androgénica de las interacciones entre estroma y epitelio

En la actualidad parece haber una interacción dinámica y recíproca entre las funciones de las células epiteliales y de las células del estroma. Estas interacciones cruzadas son mediadas a través de la organización espacial de los elementos de la matriz extracelular que conforman los enlaces de la membrana basal. Estos enlaces presentan, filtran y organizan las señales paracrinas de dos vías y el flujo de información entre estos dos compartimientos celulares. La ruptura de estas interacciones es uno de los puntos de referencia del crecimiento anormal de la próstata, que se inicia aproximadamente a los 25 años de vida, cuando la arquitectura histológica de la próstata comienza a sufrir cambios que continuarán durante toda la vida (Barron y Rawley, 2012; Wein y cols., 2015).

Los receptores transmembrana sobre la superficie celular se extienden hacia afuera a través de la membrana plasmática y forman un puente que conecta de manera directa el citoesqueleto con las proteínas y los receptores ubicados dentro de la matriz extracelular o en las células vecinas. Las moléculas de adhesión celular se encuentran en la superficie de todas las células, en las que permiten procesos dinámicos que tengan lugar durante la morfogénesis de los tejidos, durante el desarrollo y el mantenimiento de los tejidos adultos (Gonzalez-Gonzalez y cols., 2013). Las moléculas de adhesión se clasifican en cuatro tipos principales las integrinas, las cadherinas, las selectinas y las moléculas de adhesión de la superfamilia de inmunoglobulinas. La molécula más estudiada la E-cadherina que fija las células epiteliales prostáticas entre sí (Welsch, 2014).

Los andrógenos prostáticos llevan a cabo su función mediante los receptores de andrógenos. La testosterona que se sintetiza en los testículos se encuentra en sangre unida a la albúmina. Al entrar en las células de la próstata, la enzima 5 α -reductasa convierte la testosterona que se une al RA (Figura 5). Esto causa un cambio conformacional en el receptor, que se disocia de la proteína y se traslada al núcleo donde se une a elementos

sensibles a los andrógenos en los promotores de genes regulados por andrógenos (Dutt y Allen, 2009).

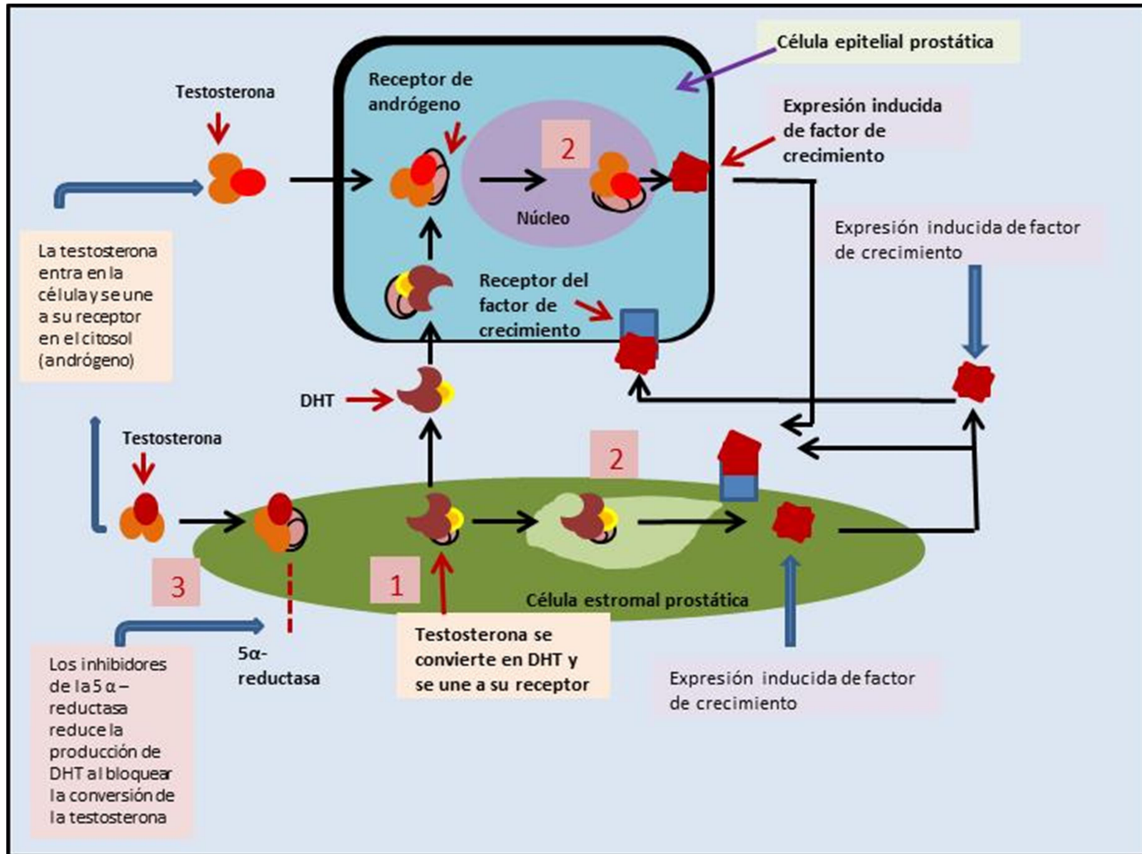


Figura 5. Interacción entre células epiteliales y el estroma prostático. Modificado de Kierszenbaum y Tres, 2012.

La DHT actúa de forma paracrina sobre las células epiteliales glandulares (Figura 5.1), jugando un papel fundamental en la producción de mitógenos que a su vez son capaces de estimular la proliferación del estroma y del epitelio (Figura 5.2). Tratamientos que inhiban la 5α-reductasa conllevan a la reducción de mitógenos como consecuencia de la disminución de DHT (Figura 5.3). Debido a esto se produce una involución del tejido, al contrario de lo que sucede al aumentar las concentraciones de andrógenos. Ambas situaciones están mediadas por una expresión selectiva de genes. En patologías prostáticas los andrógenos desempeñan un papel fundamental (Kierszenbaum y Tres, 2012; Welsch, 2014).

2 Patologías de próstata

2.1 Hiperplasia benigna de próstata (HBP)

La hiperplasia benigna de próstata es una constelación de signos y síntomas que se desarrollan en la población masculina en asociación con el envejecimiento y aumento del tamaño de la próstata (Weiny cols., 2015), su peso se puede incrementar hasta más de 150 g (Powers y Marker, 2013). Desde el punto de vista histopatológico, la hiperplasia benigna de próstata se caracteriza por un aumento en el número de células epiteliales y estromales en la zona de transición o zona periuretral de la próstata (McNeal, 1978, 1990), este aumento celular puede deberse a la alteración de la muerte celular programada, que da origen a la acumulación celular (Wein y cols., 2015). La hiperplasia benigna de próstata es un proceso patológico que contribuye al desarrollo de síntomas del tracto urinario inferior (STUI), aunque no es la única causa, en hombres de edad avanzada. Hasta el presente es imposible determinar una causa efecto (Powers y Marker, 2013). Los síntomas de la HBP son mala evacuación vesical, retención urinaria, vejiga hiperactiva, infección urinaria, hematuria e insuficiencia renal. Se ha postulado que el estrógeno y/o los cambios de la relación andrógeno-estrógeno adquiridos con los años juegan un rol importante en la patogénesis de la hiperplasia benigna de próstata (Powers y Marker, 2013). Esta hipótesis está basada en dos observaciones. Primero, la disminución de la razón testosterona-estradiol en el hombre adulto. Segundo, en la experiencia obtenida en la manipulación de andrógenos y estrógenos en modelos animales como perros y ratones produciendo la hiperplasia y STUI (Coffey y Walsh, 1990; Belanger y cols., 1994; Nicholson y cols., 2012).

La obstrucción del tracto de salida vesical puede causar varias alteraciones en la vejiga, lo que contribuye a la sintomatología y requiere intervención médica. Además, el aspecto histológico del tejido estromal en los nódulos de la hiperplasia benigna de próstata se asemeja al del mesénquima en desarrollo y al crecimiento glandular. Estos hechos llevaron al patólogo John McNeal a la hipótesis de que la hiperplasia benigna de próstata es causada por "procesos embrionarios que despiertan en una forma distorsionada en la vida adulta" (McNeal, 1990). Es posible que en la etiología de este proceso hiperplásico participen andrógenos, estrógenos, interacciones entre el estroma y el epitelio, factores de crecimiento y neurotransmisores, en forma aislada o en conjunto. Aunque es posible que las fases tempranas de la hiperplasia benigna de próstata estén asociadas con una proliferación rápida de las células, la enfermedad establecida parece mantenerse en presencia de una velocidad normal o reducida de replicación celular. Esta hipótesis podría estar avalada por la expresión elevada de los genes de las vías antiapoptóticas (Wein y cols., 2015).

2.2 Neoplasia intraepitelial prostática (PIN)

La neoplasia prostática intraepitelial (PIN) consiste en una proliferación anormal de las células secretoras de la glándula sin invasión del estroma. PIN se caracteriza por la

aparición de la hiperplasia luminal epitelial, núcleos grandes y nucléolos, una reducción de las células basales, neovascularización, aumento de la inestabilidad cromosómica, mientras mantiene la membrana basal intacta y en general se considera como una lesión pre-neoplásica en seres humanos (Rybak y cols., 2015). Hay una estrecha relación topográfica entre el PIN y los carcinomas latentes de la zona periférica (Bostwick y Qian, 2004). Esta afección comienza a aparecer en la próstata de algunos hombres entre los 20 y los 29 años de edad. Casi la mitad de los hombres tienen neoplasia prostática intraepitelial al cumplir los 50 años.

La evidencia que indica que el PIN es precursor de algunos carcinomas de próstata incluye la observación de un aumento del tamaño y el número de focos del PIN en comparación con próstata sin carcinoma, los marcadores biológicos y los cambios moleculares son similares en PIN y en carcinoma (Bostwick y cols., 1996; Häggman y cols., 1997). Sin embargo, no es necesario que haya un PIN para que se geste un carcinoma (Wein y cols., 2015).

2.3 Inflamación prostática

La inflamación de la próstata está estrechamente relacionada con el aumento de la edad en el hombre. Se atribuyen diferentes agentes etiológicos, entre estos: dietéticos, infecciones, cambios hormonales, reflujo urinario y otros factores ambientales.

La inflamación es considerada uno de los principales factores en el desarrollo y progresión de la hiperplasia benigna prostática, debido a una fuente adicional de factores de crecimiento como resultado del incremento de células inflamatorias *in situ* que se observan en muchos varones que presentan esta patología. Además, la inflamación también está relacionada con los síntomas del tracto urinario inferior (STUI) y su asociación con el cáncer fue propuesta por Virchow en 1863 (Keibel y cols., 2009; Wong y cols., 2014). Actualmente la inflamación crónica que lleva a una hiperproliferación celular es un hallazgo histopatológico común en tumores malignos de próstata (Elkhwaji, 2012; Sfanos y De Marzo, 2014). En análisis retrospectivo de biopsias concluyeron que biopsias que no presentaron signos de inflamación se reducen el riesgo de diagnóstico posterior de cáncer de próstata (Moreira y cols., 2015).

2.4 Cáncer de próstata

2.4.1. Desarrollo de la patología prostática

La mayoría de los tumores prostáticos son adenocarcinomas, es decir, se originan a partir del epitelio glandular. A pesar de esto, el cáncer de próstata se considera multifocal, ya que los tumores primarios contienen múltiples focos histológicamente independientes y genéticamente distintos. Se cree que se origina a partir de células luminares aunque los últimos estudios indican que también de células basales. Aproximadamente uno de cada

siete hombres será diagnosticado con cáncer de próstata en el transcurso de su vida (Wang y cols., 2009; Shen y Abate-Shen, 2010; Navdaev y Eble, 2011).

El cáncer de próstata se caracteriza por un crecimiento lento, incontrolado y por la ausencia de células basales entre las células luminarias (Figura 6), aunque algunos pueden crecer y propagarse rápidamente. El proceso de cambio de una célula no patológica a una célula cancerosa es directamente proporcional a la evasión de la respuesta inmune, supresión de la respuesta antitumoral y cambio en el metabolismo celular. El carcinoma puede terminar produciendo una metástasis, con invasión y migración de las células cancerosas hacia diversos lugares (Ye y cols., 2007; Shen y Abate-Shen, 2010; Hanahan y Weinberg, 2011).

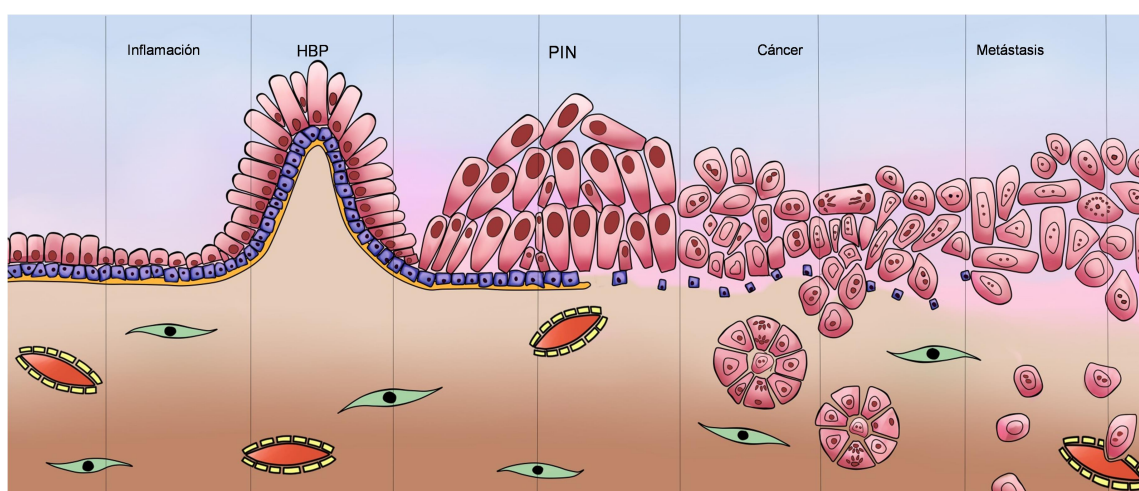


Figura 6. Modelo de los cambios del epitelio en el desarrollo de la patología prostática.

La heterogeneidad de los cánceres de próstata se hace evidente en las primeras etapas, y ha llevado a esfuerzos rigurosos para estratificar los cánceres de próstata localizados, de manera que la progresión a fases avanzadas se podría predecir sobre la base de las características más destacadas de la enfermedad temprana. La mayoría de los tejidos en fase inicial del cáncer se componen principalmente de células positivas para el antígeno prostático específico (PSA) y receptor de andrógeno (RA); mientras que el cáncer de próstata avanzado se compone principalmente de células diferenciadas e indiferenciadas que son en gran parte negativas para PSA y RA (Shtivelman y cols., 2014; Zhang y cols., 2015).

Los mecanismos implicados en el cáncer de próstata incluyen alteraciones en factores de crecimiento, citoquinas, vías de señalización inflamatorias, alteraciones en la expresión o la actividad de co-reguladores de la transcripción, mutaciones puntuales de receptores de andrógenos y la amplificación del gen del receptor de andrógenos (Chan y Dehm, 2014).

2.4.2 Detección y diagnóstico

El cáncer de próstata rara vez causa síntomas en estadio temprano. La presencia de síntomas sugiere enfermedad localmente avanzada o metástasis. Las manifestaciones son síntomas urinarios, obstrucción uretral que provoca insuficiencia renal, hematospermia o disminución del volumen de la eyaculación y en casos infrecuentes impotencia. Las manifestaciones de enfermedad metastásica son dolor óseo fracturas patológicas, anemia y edema de los miembros inferiores (Raymond y cols., 2010; Wein y cols., 2015).

Detección temprana (*screening*) del cáncer de próstata hace referencia a investigar la presencia o ausencia de esta enfermedad en poblaciones masculinas sanas y asintomáticas. Consta de dos modalidades diagnósticas como son: tacto rectal y PSA. La mayoría de los urólogos utilizan ambas pruebas. A pesar de su alta sensibilidad y baja especificidad para la identificación de pacientes portadores de cáncer de próstata, el PSA se ha establecido como el marcador de diagnóstico más fiable y ampliamente utilizado para esta condición. Valores de PSA elevados temporales no relacionados con procesos tumorales se pueden encontrar en casos de manipulación de la glándula prostática (tacto rectal o biopsia), elevada actividad sexual, cateterización urinaria y enfermedades benignas (hiperplasia), prostatitis y terapias dirigidas a la disminución de los niveles circulantes de andrógenos (Polascik y cols., 1999; Bozeman y cols., 2002). Además, se han observado niveles normales en pacientes con patología tumoral. Las tasas de detección son más altas con PSA que con el tacto rectal y máximas con ambas pruebas. Si los resultados de una de estas pruebas son anormales, se necesitará realizar pruebas adicionales para determinar si se trata de cáncer (Wein y cols., 2015).

Pruebas basadas en el PSA se han utilizado ampliamente para ayudar a la detección del cáncer de próstata desde finales de 1980 y la mortalidad específica por cáncer de próstata ha disminuido como resultado de los programas de cribado basados en el PSA en los últimos años. Sin embargo, existe la preocupación de que este descenso se ha producido a expensas de sobrediagnóstico y sobretratamiento. La mayoría de los hombres diagnosticados con cáncer de próstata se beneficiarán de no ser tratados, porque presentan tumores indolentes de poco volumen que no requieren tratamiento inmediato. El tratamiento excesivo del cáncer de próstata localizado se ha convertido en un grave problema, a causa de los efectos secundarios después de la prostatectomía (Sanz y cols., 1996; Adhyam y Gupta, 2012; Bryant y cols., 2014).

Se considera positivo un valor mayor a 4 ng/ml de PSA en suero. En los sistemas de detección calibrados por la Organización Mundial de la Salud, el umbral de PSA sérico debe de ser de 3 o 3,1 mg/l para conseguir el mismo perfil de sensibilidad/especificidad de 4 ng/ml de los sistemas calibrados tradicionalmente, de Hybritech. Cuando se obtiene un resultado positivo en el test del PSA y/o en el tacto rectal, se procede a la obtención y análisis de biopsia para asegurar el diagnóstico y, en caso de ser positivo, determinar ciertas

variables pronósticas para decidir el tipo de tratamiento a aplicar al paciente (Lilja y cols., 2008; Wolf y cols., 2010; Heidenreich y cols., 2011). Si se detecta el cáncer, el paciente puede seleccionar la vigilancia activa o una de varias opciones de tratamiento definitivo como cirugía, radioterapia o braquiterapia (Jin y cols., 2014).

a) Indicaciones de la biopsia de próstata

En la actualidad, la detección sistemática de PSA en varones asintomáticos ha determinado que se adopte la biopsia guiada por ecografía transrectal como método de referencia para el estudio histopatológico de rutina de la próstata. La presencia de nódulos focales en el tacto rectal instará, de todos modos, a una biopsia aplicando la técnica de la ecografía transrectal, independiente de las concentraciones de PSA (Wein y cols., 2015).

El grado histológico es la información más importante obtenida de la biopsia prostática con aguja y el sistema de gradación de Gleason es el empleado con mayor frecuencia (Wein y cols., 2015).

b) Sistema TNM (Tumor Nódulos Metástasis)

Después del diagnóstico de cáncer de próstata el objetivo de gradación es determinar con precisión la extensión de la enfermedad para tomar decisiones terapéuticas y evaluar el pronóstico (Wein y cols., 2015). El sistema de gradación más usado para el cáncer de próstata es el sistema TNM del American Joint Committee on Cancer (AJCC). El cáncer de próstata se clasifica en grupos de riesgo (bajo, intermedio y elevado) en función de las cifras del antígeno prostático específico, la puntuación Gleason y el estadio clínico. El sistema TNM incluye información sobre la extensión del tumor primario (categoría T) (Tabla 1), estadio que se define a partir de la información que proporciona el análisis de la pieza quirúrgica extraída con la prostatectomía radical (categoría P) (Tabla 2), si el cáncer se propagó a los ganglios linfáticos (nódulos) cercanos (categoría N) (Tabla 3). La ausencia o presencia de metástasis a distancia (categoría M) (Tabla 4). De forma breve describe el estado en que se encuentra el cáncer antes del inicio de la terapia. El número se añade a cada letra para identificar el tamaño o extensión del tumor y el grado de diseminación del cáncer. Permite al médico plantear un tratamiento apropiado, estimar el pronóstico, evaluar los resultados y facilita un lenguaje común dentro del equipo multidisciplinario.

TNM del cáncer de próstata: Tumor primario (T)	
TX	No se puede detectar el tumor primario
T0	Sin evidencias de tumor primario
T1	Tumor clínicamente inaparente, ni palpable ni visible en imagen
	T1a Tumor incidental. Presencia histológica en ≤ 5% del tejido reseccionado
	T1b Tumor incidental. Presencia histológica en > 5% del tejido reseccionado
	T1c Tumor identificado mediante biopsia por aguja (muestra tomada por registro de elevado PSA sérico)
T2	Tumor confinado dentro de la próstata
	T2a El tumor ocupa menos de la mitad o la mitad de un lóbulo
	T2b El tumor ocupa más de la mitad de uno de los lóbulos o un lóbulo entero, pero no ambos lóbulos
	T2c El tumor se extiende por ambos lóbulos
T3	El tumor se extiende más allá de la cápsula
	T3a Extensión extracapsular, unilateral o bilateral
	T3b El tumor invade la/s vesículas/s seminal/es
T4	El tumor está fijado o invade estructuras adyacentes diferentes a las vesículas seminales, como el esfínter externo, el recto, la vejiga, los músculos elevadores, y/o la pared pélvica

Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer de próstata: Tumor primario. 7ª edición del TNM del cáncer de próstata (Vallejos y cols., 2013).

TNM del cáncer de próstata: Patológica (pT)	
pT2	Órgano confinado
	pT2a Unilateral, de un lado o menos
	pT2b Unilateral, con más de la mitad de lado pero no ambos lados
	pT2c Enfermedad bilateral
pT3	Extensión extraprostática
	pT3a Extensión extraprostática o invasión microscópica del cuello de la vejiga
	pT3b Invasión de la vesícula seminal
pT4	Invasión del recto, del músculos elevador, y / o la pared pélvica

Tabla 2. Clasificación TNM del cáncer de próstata: Patológica. 7ª edición del TNM del cáncer de próstata (Vallejos y cols., 2013).

Ganglios linfáticos regionales			
TNM	-Clínicos (N)	TNM	-Anatomopatológicos (pN)
NX	No se puede determinar presencia en nódulos linfáticos locales	pNX	linfáticos regionales no muestreados
	N0 Sin evidencia de metástasis en nódulo/s		pN0 Sin evidencia de nódulos regionales positivos
	N1 Metástasis en nódulo/s linfático/s local/es		pN1 Metástasis en nódulos regionales

Tabla 3. Clasificación TNM del cáncer de próstata. Ganglios linfáticos regionales. 7ª edición del TNM del cáncer de próstata (Vallejos y cols., 2013).

TMN: Metástasis a distancia (M)	
M0	Sin evidencia de metástasis distante
M1	Metástasis distante
	M1a Metástasis en nódulos linfáticos no locales
	M1b Metástasis en hueso/s
	M1c Metástasis en otros sitios con o sin metástasis en hueso

Tabla 4. Clasificación TMN del cáncer de próstata. Metástasis. 7ª edición del TNM del cáncer de próstata (Vallejos y cols., 2013).

2.4.3. Factores pronóstico del cáncer de próstata

a) Puntuación Gleason

Gleason es el método más extendido de gradación del adenocarcinoma de próstata, es el factor pronóstico aislado más potente del comportamiento clínico, la respuesta y elección del tratamiento, siendo útil en la predicción del riesgo que tiene un paciente de morir debido a la enfermedad (Bailar y cols., 1966; Gleason y Mellinger, 1974; Epstein, 2010). El sistema de gradación Gleason se basa en los patrones microscópicos del tumor; sólo puede evaluarse en material de biopsia (biopsia con trocar o piezas quirúrgicas) y no deben utilizarse preparaciones citológicas.

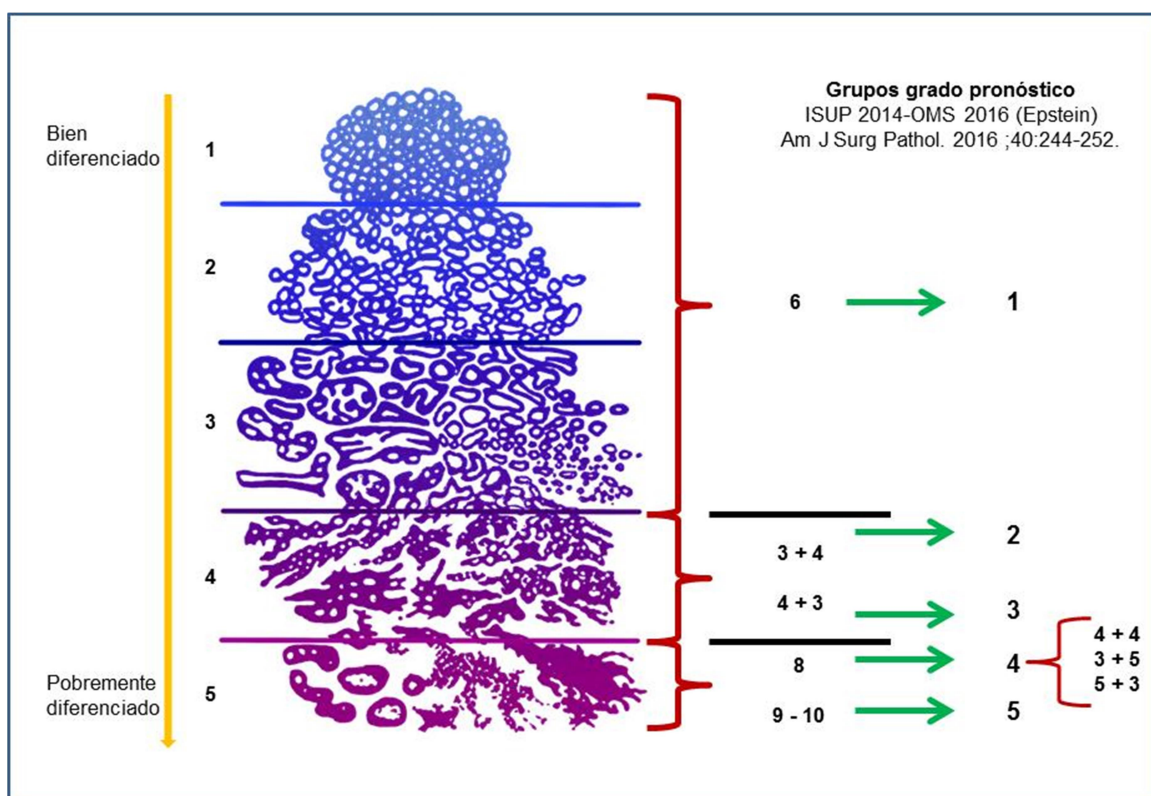


Figura 7. Diagrama de gradación Gleason. Modificado de <https://www.seap.es/documents/10157/1432467/Algaba+-SEAP+2016.pdf>.

El diagrama de gradación Gleason clásico muestra cinco patrones básicos que se denominan grados y vienen definidos por un número del 1 (más diferenciado) al 5 (menos diferenciado) (Figura 7). La puntuación Gleason es la suma de los grados del patrón mayoritario y el segundo patrón predominante del tumor, por lo que tomará valores de 2 (tumores con un patrón uniforme de grado 1) a 10 (menos diferenciados). A lo largo del tiempo, el sistema de gradación Gleason ha experimentado numerosas modificaciones. La más reciente fue consensuada en 2014 en la International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma (Epstein y cols., 2014). Esta nueva clasificación también ha sido aceptada por la Organización Mundial de Salud para la edición 2016 de Patología y Genética: Los tumores del sistema urinario y órganos genitales masculinos.

Esta gradación 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. El grado 1 es el menos agresivo y con menor probabilidad de progresión, mientras que el grado 5 tienen la mayor probabilidad de propagación sistémica temprana (Chen y Zhou, 2016; Zietman y cols., 2016).

Patrón Gleason 1. Microglándulas uniformes de distribución compacta con buena delimitación tumoral. Es poco frecuente.

Patrón Gleason 2. Glándulas algo irregulares, más separadas y con peor delimitación tumoral.

Patrón Gleason 3. Mayor variación en el tamaño de las glándulas con mala delimitación tumoral, admitiendo patrones de crecimiento papilar y glándulas ramificadas.

Patrón Gleason 4. Glándulas fusionadas en masas de contornos infiltrantes, glándulas glomeruloide, cribiforme y glándulas mal formadas.

Patrón Gleason 5. Forma poco diferenciada con poca o nula tendencia a formar glándulas, crecimiento sólido, cordonal, células sueltas, comedocarcinoma con necrosis, rosetoides con cilindros sólidos.

Para las muestras de prostatectomía radical y muestras de RTUP (Resección transuretral prostática) la puntuación Gleason es la suma de los dos grados del patrón mayoritario y el segundo patrón predominante del tumor (puntuación Gleason = patrón primario + patrón secundario). El nuevo sistema de clasificación (ISUP 2014-OMS 2016) incluye cinco grupos de grado específicos basados en los grupos de puntuación Gleason modificados. Grupo Grado 1 = puntuación Gleason ≤ 6 ; Grupo Grado 2 = puntuación Gleason $3+4=7$; Grupo Grado 3 = puntuación Gleason $4+3=7$; Grupo Grado 4 = puntuación Gleason 8; Grupo Grado 5 = puntuación Gleason 9 y 10 (Figura 7) (Gordetsky y Epstein, 2016). Este

sistema fue propuesto por el grupo del Hospital Johns Hopkins (Pierorazio y cols., 2013). La novedad más importante es la agrupación de grado pronóstico utilizando los patrones Gleason. El uso del nuevo sistema garantiza que los pacientes con Grado 1, que es el tumor más bajo posible, en la mayoría de los casos se pueden seguir con una vigilancia activa. Además, esta clasificación es más precisa en la predicción de la progresión de los grupos de estratificación de riesgo cuando se evaluó la supervivencia libre de progresión bioquímica en 5 años (Gordetsky y Epstein, 2016; Choy y cols., 2016). En general, la clasificación de Gleason modificada ha mejorado el valor predictivo del grado de cáncer de próstata (Hoogland y cols., 2014).

La puntuación Gleason sigue siendo el único predictor más potente de pronóstico del cáncer de próstata y desempeñando un papel importante en la gestión clínica (Hoogland y cols., 2014; Gordetsky y Epstein, 2016).

b) PSA sérico

El valor predictivo del PSA no está claro. Stamey y cols. (2004) en hombres tratados con prostatectomía radical describieron una mínima asociación entre PSA y el riesgo de enfermedad avanzada. Trabajos posteriores mostraron una correlación significativa entre PSA sérico, riesgo de enfermedad avanzada y progresión bioquímica tras prostatectomía radical (Freedland y cols., 2005). Freedland y cols. (2008) describieron correlación significativa entre valores elevados de PSA preoperatorio, aumento del riesgo de extensión extracapsular, implicación de márgenes quirúrgicos, invasión de vesícula seminal y recurrencia bioquímica tras prostatectomía. La duplicación del PSA (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 recurrente (Eastham, 2005).

c) 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 (Sakr y cols., 1996). Sería un marcador pronóstico independiente de progresión bioquímica tras prostatectomía radical (Theiss y cols., 1995).

d) Estatus del margen quirúrgico

Se define como la presencia de tumor extendiéndose a través de la superficie tintada que representa el lugar por donde el urólogo ha cortado para extirpar el tumor (Srigley, 2006). Un margen quirúrgico positivo es 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 (Alkhateeb y cols., 2010). La mayoría de

los estudios sugieren que solo un tercio de los pacientes con margen quirúrgico positivo tendrá progresión bioquímica (Kench y cols., 2011).

e) Metástasis en nódulos linfáticos

Marcador pronóstico independiente y adverso bien establecido (Kench y cols., 2011). Es usado para predecir el riesgo de recurrencia tras prostatectomía (Kattan y cols., 1999).

f) Invasión perineural

La importancia de la invasión perineural sigue siendo cuestionable aunque algunos autores concuerdan que es la principal vía de diseminación extracapsular del cáncer de próstata. Otros investigadores demostraron que la invasión perineural en las biopsias con aguja de próstata es un predictor independiente de recurrencia bioquímica y supervivencia después de la prostatectomía radical (DeLancey y cols., 2013).

g) Invasión de vesícula seminal

La vesícula seminal podría estar afectada por varios mecanismos: a) diseminación directa a través del complejo del ducto eyaculatorio; b) diseminación por el tejido blando extraprostático hasta la vesícula seminal; y, c) metástasis discontinua. Se ha establecido como factor pronóstico independiente y permite predecir el riesgo de recurrencia tras prostatectomía (Kattan y cols., 2001; Epstein y cols., 2005). La presencia de metástasis en vesícula seminal confiere un riesgo de recurrencia solamente superado por la presencia de metástasis en nódulo linfático (Epstein y cols., 2000). La invasión de vesícula seminal junto a margen quirúrgico positivo pueden influenciar la respuesta a radioterapia adyuvante (Swanson y cols., 2008).

3 Homeostasis: Ciclo celular, Apoptosis e Inflamación

3.1 Ciclo celular

El ciclo celular representa una serie compleja y ordenada de eventos continuos que se producen con la finalidad de que ocurra una división celular dando origen a células hijas con su correspondiente información genética. La producción de células nuevas equilibra con precisión aquellas pérdidas durante el uso y desgastes normales, con lo que se mantiene la homeostasis de los tejidos y órganos (Wein y cols., 2015).

Si la célula no se multiplica se considera que esta fuera de ciclo o en reposo, estado reversible conocido como “G₀”. La progresión y la transición de las células a través del ciclo celular están estrechamente reguladas y controladas por una serie de puntos de control

denominados *checkpoints*, que monitorizan estrechamente la integridad del ADN y comprueba que la célula está preparada para continuar con la siguiente fase (Singh y cols., 2013).

Todo el ciclo celular está afectado por proteínas-quinasas específicas de serina y de treonina denominadas quinasas dependientes de ciclinas o CDK (*cyclin-dependent kinases*) que son estimuladas por señales mitogénicas. Estas señales también activan el inicio del ciclo celular (Malumbres y Barbacid, 2001). Las CDK, como su nombre indica dependen de las ciclinas, proteínas reguladoras y activadoras enzimáticas de las CDK formando complejos específicos ciclina/CDK que actúan en periodos restringidos del ciclo celular (Frade y Ovejero-Benito, 2015; Wein y cols., 2015).

Si la célula se encuentra en G_0 , tras ser estimulada por señales mitogénicas proseguirá a la fase G_1 o fase gap 1, durante la cual se sintetizan suficientes macromoléculas y orgánulos para incrementar su tamaño preparándose para la división (Figura 8). Después de la señal estimuladora del ciclo celular se promueve la expresión de las principales ciclinas G_1 : la ciclina D y la ciclina E que conducen a la asociación con las quinasas CDK4/6 y CDK2 para formar complejos que promueven su activación. Durante esta fase G_1 temprana, la célula es sensible a las señales externas y debe superar un punto de restricción o punto R después del cual el ciclo celular se vuelve insensible a las señales extracelulares (Frade y Ovejero-Benito, 2015; Wein y cols., 2015).

La proteína de susceptibilidad al retinoblastoma pRb desempeña un papel fundamental para controlar el punto de restricción R. En las células que no se dividen pRb está hipofosforilada y se asocia con miembros de la familia E2F de los factores de transcripción, lo que inhibe la activación transcripcional de genes diana necesarios para la progresión del ciclo celular en la fase S. Durante la fase G_1 , la pRb es fosforilada progresivamente en 8 sitios diferentes por los complejos ciclina D-CDK4/6 y ciclina E-CDK2, creándose la pRb hiperfosforilada, que promueve la disociación de E2F (Krtolica y cols., 1998). La proteína E2F liberada se heterodimeriza con una o tres unidades de la ADN polimerasa y activa la transcripción de los genes diana, que incluyen los genes esenciales de la fase S (Frade y Ovejero-Benito, 2015; Wein y cols., 2015).

En este punto R la célula debe salir de G_1 y entrar a la fase S. Durante la fase S se duplica el ADN, cada cromosoma pasa a tener dos moléculas de ADN de cadena doble (cromátidas). En la fase S la ciclina E es remplazada por la ciclina A para formar los complejos A-CDK2 en la fase S temprana y A-CDK1 en la fase S tardía. Cuando se completa la fase S el complejo A-CDK2 fosforila los heterómeros E2F-DP, y termina así la actividad de E2F (Henley y Dick, 2012).

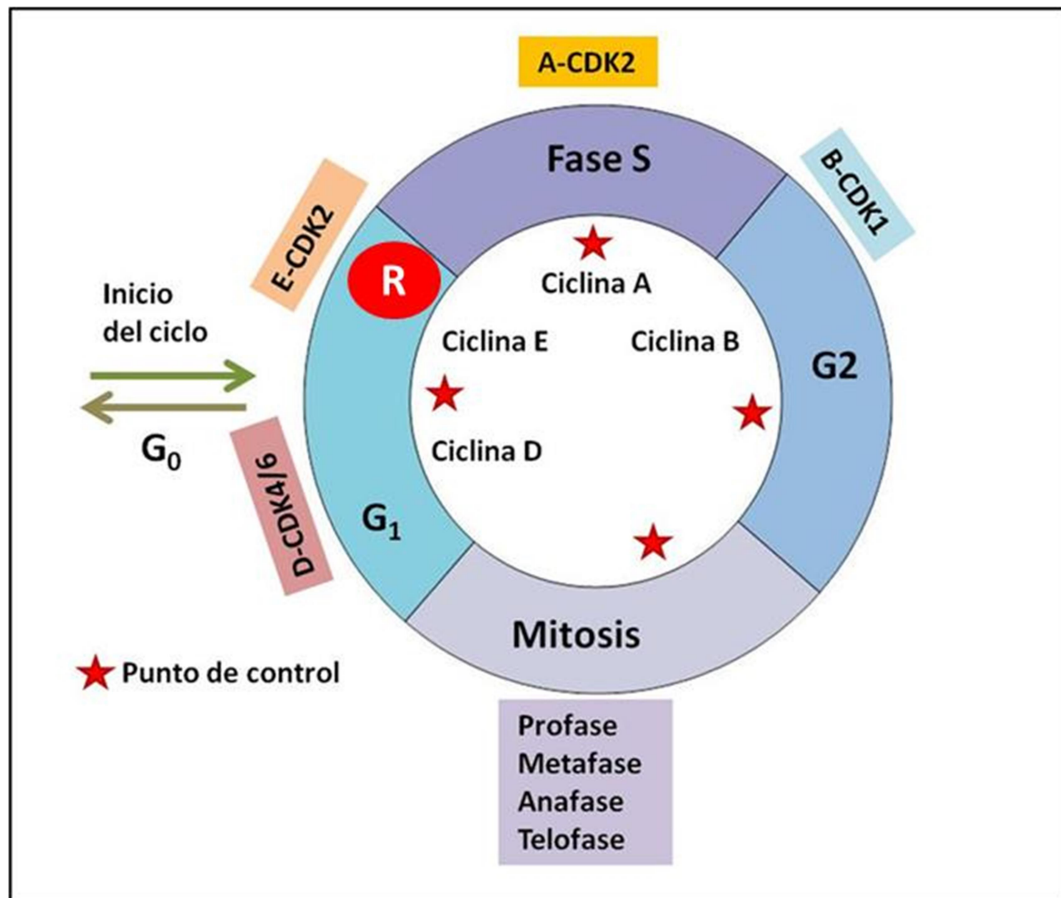


Figura 8. Diagrama del ciclo celular. Modificado de <https://seniorapbiologyreview.wikispaces.com/Cell+Cycle>.

Al finalizar la fase S, la ciclina B reemplaza la ciclina A y forma el complejo B-CDK1 que mueve la célula a la fase G₂ y hacia la mitosis (Wein y cols., 2015). Este proceso consiste en 4 fases consecutivas: profase, cuando se condensa la cromatina, nucléolos y membrana nuclear desaparecen, y se forma el huso mitótico; metafase, cuando los cromosomas se disponen en el plano ecuatorial de la célula; anafase, cuando las cromátidas se separan hacia los lados opuestos del huso mitótico; y telofase, en el que los cromosomas descondensan en la cromatina difusa, aparece la membrana nuclear, se forman 2 nuevos núcleos y la citocinesis comienza a tener lugar (Frade y Ovejero-Benito, 2015).

Además del punto de restricción R existen los *checkpoints* G₁/S antes de la fase S y G₂/M antes de la mitosis. Los puntos de control del ciclo celular emplean proteínas inhibitoras de las quinasas dependientes de ciclina (CDKI). La parada en G₁ previene la replicación aberrante del ADN y la parada en G₂ evita que se produzcan la segregación de cromosomas dañados o alterados (Lara y Sáez-Bravo, 2012). Un contribuyente crítico en los puntos de control es la proteína p53, el producto del gen TP53, localizado en la región cromosómica 17p13. p53 es conocida como un supresor tumoral y factor de transcripción pleotrópico que recibe múltiples señales de estrés y daño celular activando genes que funcionan de modo

variable en la detención del ciclo celular, si la célula no logra reparar el daño del ADN, p53 induce la apoptosis. La apoptosis inducida por p53 está mediada a través de la familia Bcl-2 (Wein y cols., 2015).

El ciclo celular también está regulado por los miembros de la familia CIP/KIP (proteínas de interacción con CDKs/proteínas inhibidoras de quinasas). Las proteínas CIP/KIP tienen la capacidad de unirse e inhibir las quinasas dependientes de ciclina (CDKs) lo que les permite regular el ciclo celular (Murray, 2004); además tienen funciones independientes de las CDK (CKIs) en la regulación de la transcripción, apoptosis y el citoesqueleto (Besson y cols., 2008). La familia CDK inhibitorias (CKIs) comprende tres proteínas: p21Cip1/WAF1, p27Kip1 y p57KIP2 (miembros de la familia CIP/KIP) (Frey y cols., 2000; Black y Black, 2012). Estas proteínas muestran dominios inhibidores homólogos entre sí, necesarios para la unión a los complejos formados por CDK4 y CDK2.

p21 es una proteína pequeña de 165 aminoácidos y es inducida en respuesta al daño del ADN a través de la actividad de la proteína supresora de tumor p53 y media la detención del ciclo celular en la fase G₁ y G₂ (Gartel, 2006; Starostina y Kipreos, 2013; Karimian y cols., 2016). Cuando el ciclo celular funciona con normalidad, p21 oscila con los más altos niveles durante las fases G₁ y G₂ (Dulić y cols., 1998). La inhibición promovida por p21 depende de dos dominios estructurales: el dominio de unión a PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación) carboxilo-terminal y el dominio inhibitorio CDK-amino terminal (Chen y cols., 1995; Luo y cols., 1995). A través del dominio C-terminal compite por la unión de PCNA con la ADN polimerasa inhibiendo la síntesis del ADN. De la misma forma, p21 se une a los complejos ciclina D-CDK4/6 y E-CDK2, inhibiendo la fosforilación de pRb en la fase G₁ (Wang y cols., 2011; Choi y cols., 2014; Naito y cols., 2015). En la fase S, p21 puede inhibir al complejo ciclina A-CDK1 y detener la transición a G₂/M (Choi y cols., 2014).

p21 se une a los factores de transcripción E2F-1, STAT3 y c-myc para inhibir su actividad transcripcional, también es capaz de activar la transcripción de genes por represión de p300-CREBBP (proteína de unión a CREB) permitiendo una retroalimentación positiva que amplifica la expresión de p21 (Abbas y Dutta, 2009). La proteína p21 actúa como efector principal de procesos anti-proliferativos independientes de la vía clásica de p53 (Abbas y Dutta, 2009). p21 a menudo está mal regulada en los procesos de carcinogénesis, pero su expresión, dependiendo del contexto y las circunstancias del microambiente celular puede tener una función dual como supresor de tumor o como oncogén (Abbas y Dutta, 2009).

p21 puede proteger la célula contra la apoptosis. Las proteínas CIP/KIP pueden bloquear la apoptosis a través de la vía CDK-independiente. p21 se une e inhibe JNK/SAPK quinasa y las MAPKs ASK1 (MAP3K5) para bloquear el estrés inducido por la apoptosis (Dotto, 2000; Roninson, 2002). p21 fosforilada por la proteína quinasa A (PKA) puede inhibir la

apoptosis mediada por Fas mediante la unión a pro-caspasa-3, evitando que se convierta en una caspasa activa (Suzuki y cols., 2000).

La proteína p27 es un miembro de la familia CIP/KIP. p27 regula negativamente la progresión de la célula de G₁ a la fase S del ciclo celular mediante la unión y la inhibición de quinasas dependientes de ciclina (CDKs) (Cheville., 1998; Sherr y Roberts, 1999). p27 facilita la importación nuclear de los complejos de ciclina D-CDK4/6 e inactiva la ciclina A y los complejos de ciclina E-CDK2 (Besson y cols., 2008; Chu y cols., 2008). Además de su papel como un inhibidor del ciclo celular, p27 también regula la apoptosis. p27 podría tener actividad supresora de tumores, y la disminución de la expresión de p27 se asocia con el comportamiento agresivo del tumor en varios tumores malignos humanos. Las alteraciones genéticas de p27 son raras, en su caso están mal regulados los mecanismos asociados a la transcripción (Garrett-Engele y cols., 2007; Chu y cols., 2008).

Otra proteína nuclear implicada en el ciclo celular es Ki67 que se asocia con la síntesis de ARN ribosomal y puede ser necesaria para la proliferación celular (Lindsay y cols., 2016). Ki67 en humanos es codificada por el gen MKI67 ubicado en el brazo largo del cromosoma 10, siendo una proteína de gran tamaño con 395 kDa (Duchrow y cols., 1996; Kobayashi y cols., 2013). La expresión de Ki67 varía en las diferentes fases del ciclo celular. Durante la interfase, el antígeno se puede detectar exclusivamente dentro del núcleo, mientras que en la mitosis la mayoría de la proteína se traslada a la superficie de los cromosomas (Scholzen y Gerdes, 2000). Las células expresan Ki67 durante G₁, en niveles bajos en la fase S, se elevan al máximo en G₂ y en las fases de la mitosis, pero no se expresa durante la fase de reposo G₀ (Yuan y cols., 2015).

3.2 Apoptosis

La apoptosis también conocida como muerte celular programada, es un proceso regulado que utilizan los organismos multicelulares para eliminar las células innecesarias o perjudiciales (Plati y cols., 2011; Wein y cols., 2015). Es un mecanismo fisiológico crucial para el mantenimiento de la homeostasis glandular normal, por lo tanto, debe existir un balance entre proliferación y muerte celular para evitar que el tejido crezca indefinidamente y se regenere de forma correcta (Parsons y Green, 2010). La disrupción del delicado balance mitosis vs apoptosis puede desembocar en trastornos autoinmunes, enfermedades degenerativas y cáncer (Parsons y Green, 2010; Lara y Sáez-Bravo, 2012). La apoptosis contrasta mucho con la necrosis, una forma no programada de muerte celular, en la cual las células con lesiones agudas se hinchan, explotan y liberan bruscamente su contenido, que actúa como un potente inductor de la respuesta inflamatoria (Wein y cols., 2015).

La apoptosis es un proceso más ordenado que la necrosis que requiere energía, definido principalmente por sus características morfológicas: redondeamiento de la célula, retracción de pseudópodos, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear (cariorrexis), el

encogimiento del citoplasma (picnosis), generación de evaginaciones esféricas en la membrana plasmática (blebs) y la descomposición de la célula en fragmentos discretos (cuerpos apoptóticos), la inmersión de las células por los fagocitos profesionales u otras células dotadas de actividad fagocítica (Kroemer y cols., 2009; Demaria y cols., 2010; Wein y cols., 2015). La apoptosis está extremadamente regulada por un sistema evolutivo conservado de señales positivas y negativas cuyo equilibrio determina si la célula sufrirá apoptosis. Varias vías de señalización pueden modular la apoptosis que involucra las proteínas Bcl-2 y las proteínas inhibidoras de la apoptosis (*Inhibitors of apoptosis proteins*) IAPs (Plati y cols., 2011).

3.2.1 La familia Bcl-2

Los miembros de la familia de Bcl-2 se puede subdividir en grupos basados en su estructura y función (Figura 9). Las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (*antagonist of cell death*), Bcl-xL (*Bcl-2L1 long isoform*), y Mcl-1 (*myeloid cell leukemia-1, Bcl-2L3*) se localizan en la membrana mitocondrial externa y bloquean las funciones de las proteínas pro-apoptóticas (Dai y Grant, 2007; Renault y Chipuk, 2014). Las proteínas pro-apoptóticas se subdividen en dos grupos: Bax (*Bcl-2 Associated X protein*) y Bak (*Bcl-2 Antagonist Killer 1*) que participan directamente en la formación de poros en la membrana externa mitocondrial (MOMP), que conduce a la muerte celular en el punto de no retorno (Chipuk y Green, 2008; Davids y Letai, 2012). El segundo grupo de miembros de la familia Bcl-2 pro-apoptóticos se compone de proteínas que comparten sólo el dominio BH3. Ejemplos de esta clase incluyen: Bad (*Bcl-2 antagonist of cell death*), Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*), Nova y PUMA (*p53 up-regulated mediator of apoptosis*). Estas proteínas tienen funciones clave para atar y regular tanto las proteínas efectoras anti-apoptóticas como las pro-apoptóticas (Renault y Chipuk, 2014). Básicamente las proteínas BH3 solo promueven la apoptosis de una forma directa mediante la unión y oligomerización de Bak y Bax o indirectamente mediante la neutralización de los miembros de la familia anti-apoptóticas (Strasser y cols., 2011; Renault y Chipuk, 2014).

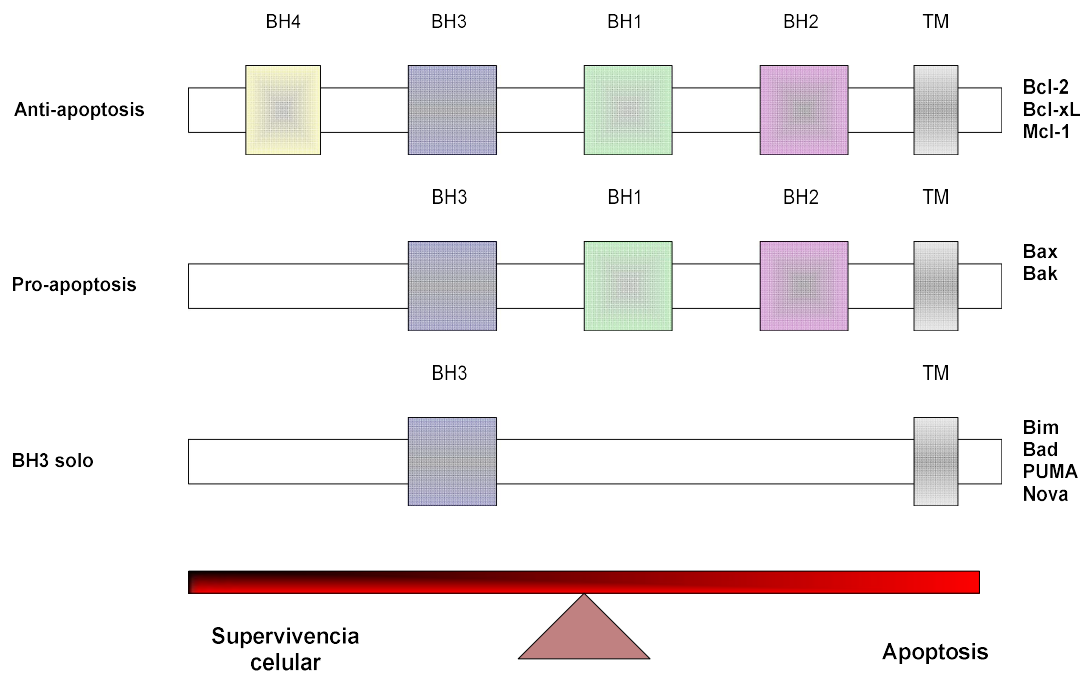


Figura 9. Miembros de la familia Bcl-2 con los respectivos miembros de cada subfamilia. La familia Bcl-2 se clasifica en tres subgrupos según la función y composición de dominios BH. Todos los miembros de de la familia poseen al menos uno de los cuatro dominios BH, denominados BH1, BH2, BH3 y BH4, y muchos incluyen el dominio transmembrana (TM). Los miembros anti-apoptóticos tienen de tres a cuatro dominios BH, igual a los miembros pro-apoptóticos. Los BH3 solo son un subconjunto de proteínas pro-apoptóticas que sólo llevan un dominio BH. Las proteínas Bcl-2 juegan un papel clave en la mediación del equilibrio entre la supervivencia celular y la muerte celular. Modificado de Plati y cols., 2011; Thomas y cols., 2013.

3.2.2 Proteínas inhibidoras de la apoptosis

Las proteínas inhibidoras de la apoptosis (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) IAPs son reguladores esenciales de la apoptosis que impiden la activación de las caspasas o interfieren con las proteínas pro-apoptóticas como SMAC/DIABLO que se liberan desde la mitocondria junto con el citocromo c en respuestas a estímulos de muerte (Khan y Bisen, 2013; Falkenhorst y cols., 2016). La familia de las IAPs está representada en humanos por ocho miembros: NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*), XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*), ILP2 (*IAP-like protein 2*), c-IAP-1 (*cellular IAP*), c-IAP-2, BRUCE (*Baculoviral IAP repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme*), Survivin y Livin. Las IAPs promueven la supervivencia celular mediante la interacción con las vías de la apoptosis y la activación de la progresión del ciclo celular.

En términos generales, hay dos vías principales por las cuales una célula puede involucrarse en la apoptosis: la vía apoptótica extrínseca y la vía apoptótica intrínseca. La vía apoptótica intrínseca o mitocondrial controla las condiciones dentro de la célula y responde a distintas señales de estrés (Figura 10). Durante la apoptosis intrínseca, se forman poros en la membrana mitocondrial externa (OMM) en un proceso denominado permeabilización

mitocondrial de la membrana externa (MOMP) (Youle y Strasser, 2008). Esto permite la disipación del potencial mitocondrial transmembrana con la consecuente depleción del ATP, liberando el citocromo c, desde el espacio intermembrana hacia el citoplasma. El aumento de los niveles de citocromo c en el citosol induce la oligomerización de la proteína APAF-1 (*apoptosis inducing factor*). El citocromo c se une a la β -hélice en APAF-1 para activar el intercambio de nucleótidos y el montaje paso a paso de un apoptosoma en forma de heptámero (Wu y Bratton, 2012; Zhou y cols., 2015). El apoptosoma produce la activación de una caspasa iniciadora, y activa las caspasas ejecutoras e induce la muerte celular (Liu y cols., 1996; Li y cols., 1997; Ow y cols., 2008). MOMP se logra a través de las acciones coordinadas de los miembros pro-apoptóticos y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 (Parsons y Green, 2010; Galluzzi y cols., 2015).

La vía apoptótica extrínseca es mediada a través de receptores de superficie celular llamados “receptores de la muerte” (Figura 10). Entre ellos están: TNFR1 (*tumour necrosis factor type-I receptor*), Fas, DR3 y los receptores de TRAIL (TRAIL-R1 y TRAIL-R2) (Jin y El-Deiry, 2005; Guicciardi y Gores, 2009). Todos los receptores de muerte contienen un dominio extracelular rico en cisteína de unión al ligando y un dominio de muerte intracelular para la transmisión de señales a través del reclutamiento de efectores (Aggarwal, 2003; Zhang y Yu, 2013). Los ligandos pro-apoptóticos pertenecen a la superfamilia de citoquinas TNF que bien pueden estar presentes en la superficie celular o secretadas en el espacio extracelular (Ashkenazi, 2008). Tras la unión de ligandos pro-apoptóticos a sus respectivos receptores, cada receptor puede formar independientemente un complejo de señalización inductor de la muerte DISC (*death-inducing signalling complex*) (Kischkel y cols., 1995; Muzio y cols., 1996; Ashkenazi, 2008). Esto permite la oligomerización de Fas tras la unión de su ligando por la molécula adaptadora FADD que facilita el reclutamiento de la procaspasa-8 y otras proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis (Ashkenazi, 2008).

Las proteínas apoptóticas y no apoptóticas convergen en una familia importante de proteasas conocidas como caspasas (*cysteine-dependent aspartyl-specific protease*), que tienen un papel central en la ejecución de la apoptosis celular. Las caspasas son clasificadas a grandes rasgos en iniciadoras (-8, -9 y -10) o caspasas ejecutoras (-3, -6 y -7) (Olsson y Zhivotovsky, 2011; Bai y cols, 2016). Las caspasas -3, -8 y -9 se sintetizan como proenzimas inactivas que son activadas por escisión proteolítica en células que experimentan apoptosis (Bai y cols, 2016). La caspasa-3 amplifica las señales de la vía intrínseca y extrínseca (Lakhani y cols., 2006). La caspasa-8 es importante en la vía extrínseca mediada por los receptores de muerte, y se somete a una auto-división para convertirse en forma activa. A través de la escisión, la caspasa-8 activada, activa las caspasas efectoras (Sakamaki y Satou, 2009; Bai y cols., 2016).

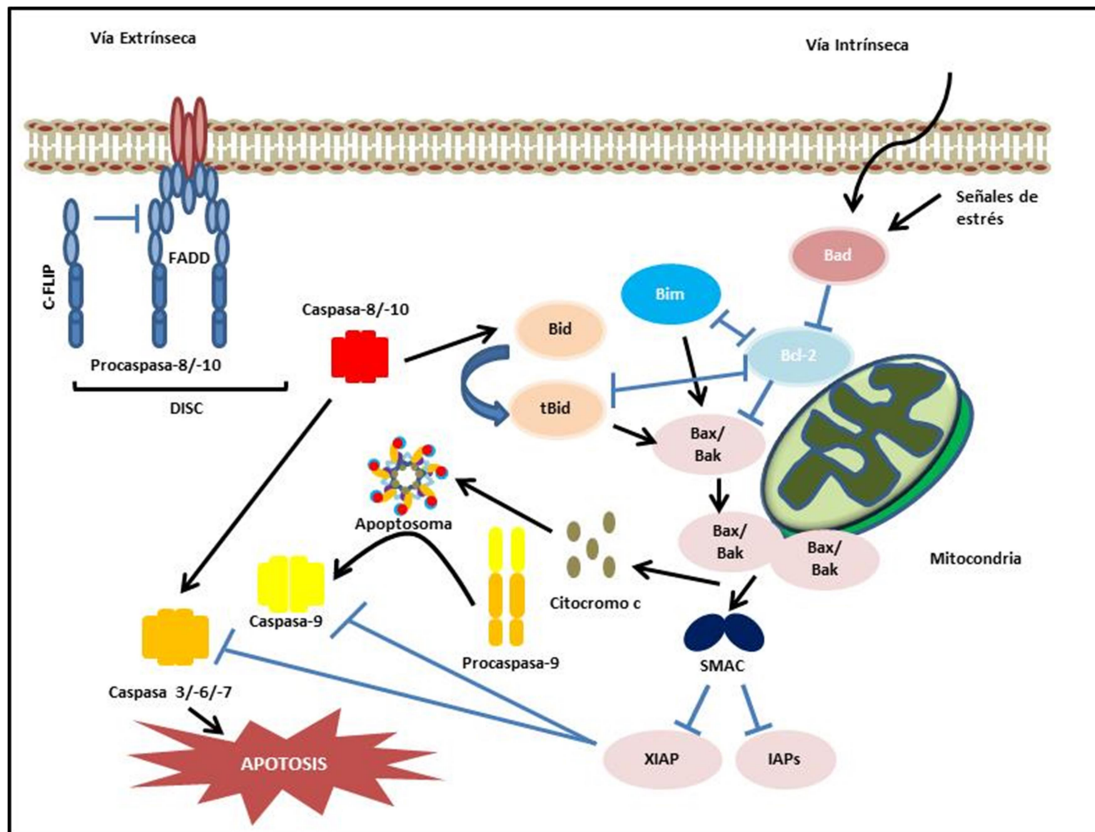


Figura 10. Vía apoptótica extrínseca e intrínseca. La vía intrínseca es activada por privación de factores de crecimiento, daño del ADN y por estímulos de estrés que actúan sobre miembros de la familia Bcl-2 BH3 solo como Bad y Bim que inician la señalización de apoptosis mediante la unión a las proteínas pro-supervivencia como Bcl-2 y se libera Bax y/o Bak para promover la pérdida del potencial de membrana externa y la liberación de citocromo c y la activación de la caspasa-9, caspasa-3 y apoptosis. La vía extrínseca se inicia por la activación de receptores de muerte, como FAS adaptador (FADD). Esto resulta en la activación de la cascada de caspasa y apoptosis (Wali y cols., 2013). Modificado de Plati y cols., 2011.

La caspasa-8 también escinde Bid a una forma truncada (tBid) que se acopla a la ruta mitocondrial para amplificar la respuesta apoptótica (Shalini y cols., 2015). La caspasa-9 es considerada la caspasa canónica en la ruta mitocondrial intrínseca que está regulada principalmente por la familia Bcl-2 (Fuentes-Prior y Salvesen, 2004).

Las cIAP1/2 inhibe la apoptosis extrínseca, inhibiendo indirectamente la caspasa-8 y regulando tanto la vía de señalización canónica como la no canónica de NF- κ B. También las cIAP1/2 son capaces de secuestrar moléculas pro-apoptóticas como SMAC/DIABLO. Por otro lado, XIAP es capaz de inhibir directamente a la caspasa efectora-3 y -7, y la caspasa-9 iniciadora (Khan y Bisen, 2013; Gyrd-Hansen y Meier, 2010). Ambas, cIAP1/2 y XIAP inhiben la apoptosis por degradación mediada por ubiquitina y la inactivación no degradativa de las caspasas (Gyrd-Hansen y Meier, 2010).

3.3 Inflamación

El fracaso de la homeostasis ocurre cuando los mecanismos fisiológicos pierden el control dando como resultado una mala regulación que lleva en definitiva a la prevalencia de enfermedades crónicas como la inflamación (Kotas y Medzhitov, 2015). La inflamación se considera un factor causal en varios tumores humanos, incluyendo el cáncer de próstata. Sin embargo, la conexión inflamación persistente y cáncer no se corresponde completamente (Saigo y cols., 2008; Mantovani y cols., 2008; Balkwill y Mantovani, 2010, 2012). El equilibrio entre las respuestas inmunes pro y anti-inflamatorias de las células huésped durante la inflamación es fundamental para determinar el destino de la célula (Kidane y cols., 2014).

En los procesos inflamatorios están involucradas las citoquinas que juegan un papel fundamental en el funcionamiento fisiológico de la glándula prostática. Las citoquinas son un grupo de proteínas secretadas de bajo peso molecular que se unen a receptores específicos de la membrana celular. Es aquí donde van a desarrollar su función mediante la iniciación de una serie de cascadas de transducción. Las citoquinas pueden ser pro-inflamatorias (IL-1, TNF- α e IL-6) y anti-inflamatorias (EGF y TGF- β).

3.3.1 La familia de Interleuquina-1 (IL-1)

La familia de Interleuquina-1 (IL-1) comprende dos ligando bioactivos (IL-1 α y IL-1 β), que se unen a dos tipos de receptores transmembranas (IL-1RI y IL-1RII), y un receptor específico antagonista (IL-1Ra) (Dinarello, 1998). La afinidad de la IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra por los receptores IL-1RI e IL-1RII se ve modificada en función del ligando que se presente. IL-1 α e IL-1Ra presentan mayor afinidad por IL-1RI que IL-1 β , mientras que la IL-1 β tiene mayor afinidad por IL-1RII.

La IL-1 afecta prácticamente a todas las células y órganos, es un mediador central de la inmunidad innata y patogénico principal de enfermedades autoinflamatorias, autoinmunes, infecciosas y degenerativas (Dinarello, 2009; 2010; Dinarello, 2012; Garlanda y cols., 2013). La IL-1 α e IL-1 β se han implicado en la promoción de la angiogénesis, crecimiento tumoral y metástasis en modelos experimentales de cáncer, estando asociado con la biología del tumor más agresivo (Elaraj y cols., 2004). IL-1 α e IL-1 β son codificada por genes distintos, se unen al mismo receptor (IL-1RI) y tienen propiedades biológicas similares.

El precursor de la IL-1 α está presente en las capas epiteliales y en presencia de necrosis tumoral es liberado totalmente activo, sale del núcleo y reside en el citosol (Cohen y cols., 2010; Garlanda y cols., 2013). Por el contrario, tras una señal de apoptosis la IL-1 α se localiza en el núcleo y se mantiene fuertemente unida a la cromatina y funciona como componente de la transcripción para genes pro-inflamatorios (Dinarello, 2011; Garlanda y

cols., 2013). Algunas células cancerosas pueden expresar en la membrana IL-1a (IL-1a de membrana) que puede aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales. Esto le permite servir en la vigilancia inmune anti-tumor y la regresión del tumor, sin embargo, en el ambiente tumoral al morir la célula el precursor de la IL-1a liberado (IL-1a segregable) es una citoquina altamente pro-inflamatoria (Rider y cols., 2013; Voronov y cols., 2013; Oliveira y cols., 2014). Al contrario, el precursor de la IL-1B no está activo, se origina en las células hematopoyéticas y nunca se ha observado en el núcleo (Dinarello, 2011; Garlanda y cols., 2013).

La vía IL-1 está estrechamente regulada en varios niveles por diversos mecanismos que incluyen al receptor antagonista (IL-1Ra), receptor señuelo (IL-1RII), complejos de receptores negativos dominantes y reguladores negativos (Garlanda y cols., 2013). La activación mal regulada de estos receptores potencialmente median reacciones inflamatorias locales y sistémicas perjudiciales (Garlanda y cols., 2013). El receptor tipo I (IL-1RI) es de señalización, mientras que el tipo II (IL-1RII) sirve como una diana señuelo, que actúa para reducir las cantidades excesivas de IL-1 (Apte y Voronov, 2008; Sims y Smith, 2010). El receptor IL-1RII se libera en forma soluble como consecuencia del procesamiento proteolítico o corte y empalme alternativo y regula la actividad de IL-1 por diferentes mecanismos (Kuhn y cols., 2007; Lorenzen, 2012; Garlanda y cols., 2013). IL-1Ra se une a IL1RI y es específico para la prevención de la actividad de IL-1a e IL-1B (Dinarello, 2011).

3.3.2 TNF-a

El factor de necrosis tumoral (*Tumor necrosis factor*) TNF es una citoquina pro-inflamatoria que media un amplio espectro de respuestas celulares. TNF está implicado en varias enfermedades incluyendo cáncer y ejerce sus funciones a través de dos receptores: TNFR1 que se une preferentemente a TNF-a soluble y TNFR2 que se encuentra en las células del linaje hematopoyético y que tiene especificidad por la forma transmembranosa del TNF-a (Balkwill, 2009; Borghi y cols., 2016). La unión del factor de necrosis tumoral a su receptor de superficie involucra múltiples vías de transducción de señales, incluyendo las caspasas, NF- κ B y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), responsables de la transmisión de señales extracelulares evocadas por factores de crecimiento peptídicos, hormonas, citoquinas o varias clases de estrés (Kholodenko y Birtwistle, 2009; Kyriakis y Avruch, 2012).

3.3.3 IL-6

IL-6 (interleuquina-6) es una citoquina multifuncional que está implicada en numerosos procesos inflamatorios. IL-6 es producida por diferentes tipos celulares y dependiendo del contexto celular puede ejercer una amplia variedad de funciones actuando mediante un receptor de membrana. Este receptor está constituido por IL-6R α (receptor α de la IL-6) y

gp130 (glicoproteína 130). Primero se produce una unión de IL-6 a IL-6R α , aunque esta unión no es suficiente para iniciar la señal de transducción y atraer a gp-130 favoreciendo la heterodimerización e iniciando la señal intracelular. Se ha visto que IL-6 estimula el desarrollo de diferentes tumores como el carcinoma de mama, colon o próstata (Hibi y cols., 1996; Grivennikov y cols., 2010; Cansino y cols., 2011).

Varias líneas de investigación apuntan que la IL-6 juega un papel contributivo en la iniciación y progresión del cáncer de próstata ya que la IL-6 y su receptor pueden ser originados en la próstata y su sobreexpresión se ha detectado en próstata normal, en epitelio maligno y en PIN de alto grado (Hobisch y cols., 2000; Rodríguez-Berriguete y cols., 2010). Los niveles circulantes de IL-6 se encuentran elevados en los pacientes con cáncer de próstata metastásico y en el cáncer de próstata refractario, pudiendo funcionar como activador de receptores de andrógeno (Smith y cols., 2001; Culig y Pühr, 2012).

IL-6 funciona como factor de crecimiento paracrino para las células de cáncer de próstata sensibles a andrógenos (LNCaP) protegiendo a las células de la apoptosis en la terapia de privación de andrógenos y como un factor de crecimiento autocrino para las células andrógenos insensibles DU154 y PC3 (Okamoto y Oyasu, 1996; Dutt y Allen, 2009).

3.3.4 Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

El factor de crecimiento epidérmico EGF (*Epidermal growth factor*) es una citoquina implicada en el crecimiento normal y anormal de la próstata. EGF inicia su señalización mediante la unión a su receptor ErbB, localizándose en las células neuroendocrinas del epitelio prostático (Yun y cols., 2013). El receptor ErbB (*Erythroblastic leukemia viral oncogene*) es una familia compuesta por cuatro miembros: (EGFR)/ERBB1/HER1, ERBB2/HER2, ERBB3/HER3 y ERBB4/HER4 (Hynes y Lane, 2005). La unión de EGF con su receptor dentro de la célula desencadena actividades tirosina quinasa que le permite controlar importantes actividades intracelulares. Diversos estudios apuntan que son independientes de la acción de andrógenos y tienen la capacidad de ser autofosforilados. EGFR activa varias cascadas de señalización como las MAPKs, PI3K-Akt en cánceres.

3.3.5 Factor de crecimiento transformante (TGF-B)

El Factor de crecimiento transformante TGF-B (*Transforming growth factor beta*) es una citoquina pleiotrópica potente que regula una amplia variedad de procesos en diferentes tipos de células como la diferenciación y la homeostasis entre otros. La actividad TGF-B induce múltiples efectos en diferentes vías de señalización promoviendo la inhibición de tumores (Dvorak, 1986; Stover y cols., 2007; Príncipe y cols., 2014). TGF-B comprende tres isoformas (TGF-B 1, TGF-B 2 y TGF-B 3) que se sintetizan inicialmente como homodímeros (75 kDa), conocidas como pro-TGF-B. Pro-TGF-B se escinde en el aparato de Golgi para formar el homodímero (25 kDa) de TGF-B maduro (Annes y cols., 2003).

En tejidos normales TGF-B ejerce efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico sobre células epiteliales para limitar la aparición y el crecimiento de carcinomas malignos (Hanahan y Weinberg, 2000; Siegel y Massague, 2003), así como facilitar las interacciones entre los fibroblastos y las células epiteliales para suprimir aún más eventos de iniciación del cáncer (Bhowmick y cols., 2004). TGF-B se une a dos receptores (TGFBR1 y TGFBR2) y una vez activado el ligando, la señalización de TGF-B está mediada a través de Smad (vía canónica) y vía no Smad. Ambas vías juegan múltiples papeles en la homeostasis, en particular en el crecimiento y la plasticidad de las células epiteliales (Hata y David, 2009; Príncipe y cols., 2014).

El factor de crecimiento transformante beta se ha postulado que tiene un doble papel en la progresión del tumor: como supresor en etapas tempranas de la carcinogénesis y como prooncogen en los últimos pasos de la enfermedad metastásica (Roberts y Wakefield, 2003; Krstić y cols., 2015). En el epitelio, TGF-B inhibe la proliferación celular, sin embargo, en el mesénquima promueve la proliferación celular (Moses, 1992; Fuxe y Karlsson, 2012; Imamura y cols., 2012). Prácticamente todos los tumores epiteliales muestran resistencia parcial o total a los efectos inhibitorios de TGF-B, lo que se conoce como insensibilidad a las señales anti-crecimiento, ya sea debido a la inactivación de mutaciones o represión de uno o más genes de la vía de señalización (Elliott y Blobbe, 2005; Bierie y Moses, 2006; Padua y Massagué, 2009). Como respuesta a esta insensibilidad las células cancerosas normalmente secretan grandes cantidades de TGF-B, siendo la producción paralela a la progresión del cáncer (Pasche, 2001).

La mala regulación en la vía de TGF-B conduce a una amplia reprogramación de señal, permitiendo que las células cancerosas se apropien de las funciones normales para asegurar su propia supervivencia (Príncipe y cols., 2014). TGF-B tienen actividad pro-apoptótica por la vía dependiente o independiente de Smad o p53, aunque durante la transformación maligna, la señalización de TGF-B se altera para promover la supervivencia celular evadiendo la apoptosis (Motyl y cols., 1998; Perlmany y cols., 2001; Tian y cols., 2011). La autosuficiencia en las señales de crecimiento en las células cancerosas se consigue a través de TGF-B por su capacidad de inducir la expresión de citoquinas, factores de crecimiento o sus receptores, además de activar la vía Ras/Raf/MAPK (Elliott y Blobbe, 2005). TGF-B puede estimular la angiogénesis por sus efectos sobre los factores angiogénicos locales tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) (Sánchez-Elsner y cols., 2001; Massagué, 2008; Padua y Massagué, 2009). TGF-B induce la transición epitelio mesénquima (EMT). Las células cancerosas a menudo responden a TGF-B mediante la estimulación de la expresión de enzimas que degradan la matriz, lo que contribuye a la degradación de la matriz extracelular y la evasión a través de la transición epitelio mesénquima, característica patológica en la neoplasia promoviendo la evasión tisular y la homeostasis (Derynck y Zhang, 2003; Elliott y Blobbe, 2005). TGF-B promueve EMT a través de la combinación de

eventos transcripcionales dependientes de Smad y efectos Smad independientes en los complejos de unión celular (Massagué, 2008). Altos niveles de TGF- β se observan en cánceres avanzados e inactivan los sistemas de inmunovigilancia antitumoral (Meulmeester y Ten Dijke, 2011; Korrodi-Gregório y cols., 2014).

3.3.6 La familia de las MAPKs

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) realizan un papel importante en la regulación de la proliferación normal de las células (Roberts y Der, 2007). Las MAPKs son un grupo heterogéneo de enzimas responsables de la fosforilación de aminoácidos de serina y treonina en muchas proteínas y son componentes de las cascadas de señalización de diversos estímulos extracelulares que convergen para iniciar la inflamación, incluyendo la producción de citoquinas proinflamatorias (Broom y cols., 2009). Las tres principales subfamilias de MAPKs son: quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), quinasas c-Jun NH₂ terminales (JNKs) y las quinasas de p38 MAP. En general, ERKs son activadas por mitógenos y señales de diferenciación, mientras que JNK y p38 son activadas por estímulos de estrés (Sabio y cols., 2014). Cada una de estas cascadas están compuestas por tres quinasas que actúan secuencialmente una tras otra MAPKKK/MAP3K, MAPKK/MAP2K, y MAPK que con regularidad se alteran en el cáncer humano (Figura 11) (Akinleye y cols., 2013b).

a) Proteínas MEK

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos, MAPKK/MAP2K, se conocen comúnmente como proteínas MEK. Las MEK pertenecen a una familia de enzimas que tienen como objetivos específicos las cuatro vías de MAPKs (ERK, JNKs, p38 y ERK5) (Akinleye y cols., 2013b). Estas enzimas MEK fosforilan selectivamente residuos serina/treonina y tirosina dentro del bucle de activación de sus sustratos específicos MAP quinasa. Hasta el momento han sido identificadas 7 enzimas MEK (Chang y Karin, 2001; Akinleye y cols., 2013b). Como toda proteína quinasa tienen un dominio catalítico (dominio quinasa), un dominio amino terminal, y el dominio carboxilo terminal. MEK1 y MEK2 están estrechamente relacionadas. Ambas participan en la cascada de transducción de señales Ras/Raf/MEK/ERK que se activa por una variedad de factores de crecimiento, hormonas y citoquinas (Akinleye y cols., 2013b). En la secuencia N-terminal, MEK1/2 contiene un segmento inhibidor/alostérico, una secuencia de exportación nuclear que tiene una característica estructural única y un sitio de acoplamiento (D-dominio) que ayuda en sustratos de ERK vinculante. El dominio quinasa contiene un sitio de unión y un aparato catalítico ATP. El C-terminal alberga el dominio para el acoplamiento versátil (DVD) que funciona como un sitio de unión importante para los componentes de la cascada Ras/Raf/MEK/ERK (Takekawa y cols., 2005). La cascada de señalización MEK1/2 se activa mediante la unión a receptores tirosina quinasas (RTK), lo que lleva a la dimerización de los receptores y la autofosforilación de residuos de tirosina específicos en

su región C-terminal. Estos receptores activados reclutan y fosforilan proteínas adaptadoras Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) y SOS (*Son of Sevenless*) que a su vez interactúan con GTPasa Ras y causan su activación (Sacks, 2006; Liang y cols., 2011).

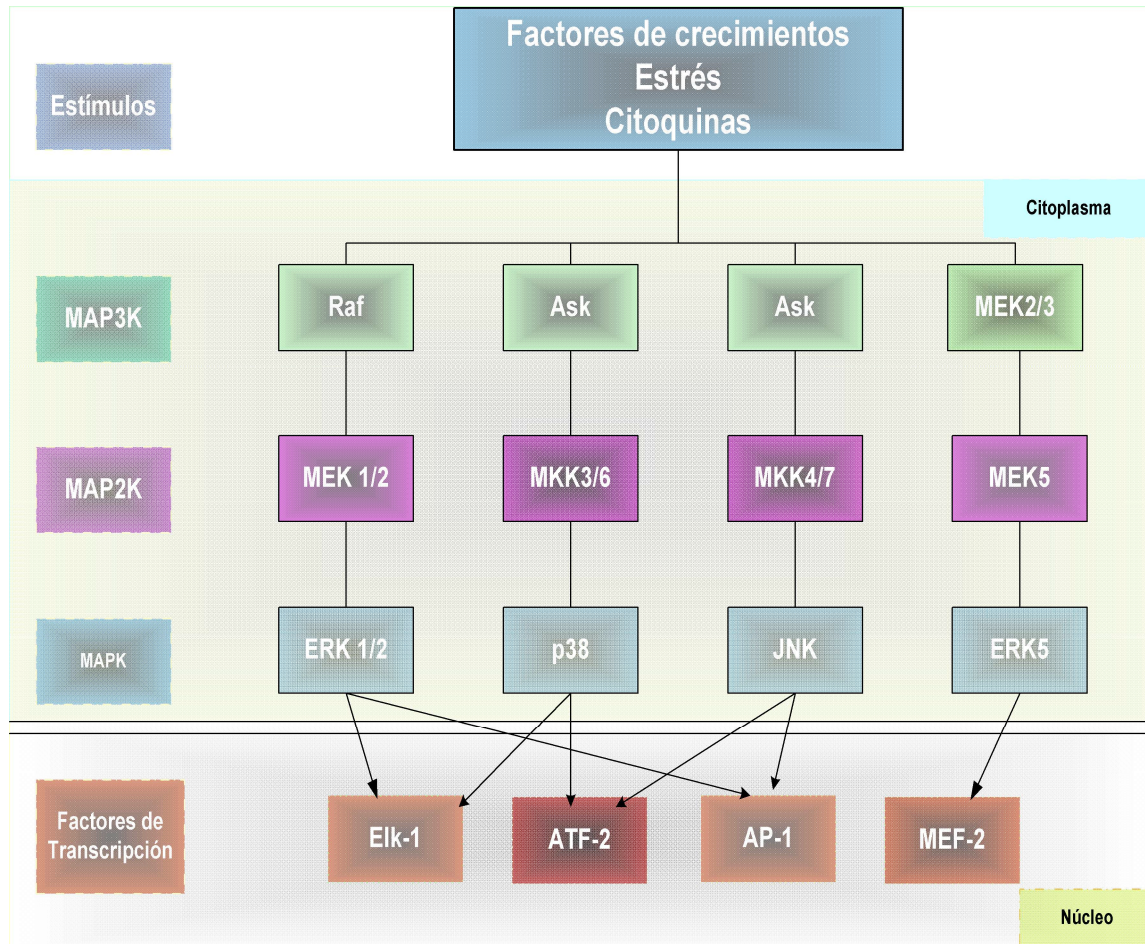


Figura 11. Vías de las MAPKs. Los mitógenos como factores de crecimiento, citoquinas y estrés activan las MAP3Ks, subsecuentemente resulta la fosforilación de MAP2Ks. La MAP2Ks fosforiladas activan las MAKs terminales como son ERK1/2, p38, JNK y ERK5, terminando con la transcripción de factores como son Elk-1, ATF-2, AP-1 y MEF-2. Modificado de Akinleye y cols., 2013b.

MEK3 y MEK6 son funcionalmente similares. Estructuralmente MEK6 difiere de MEK3 en las regiones C- y N-terminal, sin embargo, los sitios de unión de ATP, serina/treonina y tirosina se conservan (Han y cols., 1996; Stein y cols., 1996). Las MAP3K y sus mecanismos de regulación pueden proporcionar la capacidad de responder a una amplia gama de estímulos y de integrar la activación de p38 MAPK con otras vías de señalización (Koul y cols., 2013). Las MAP3K activas fosforilan y son capaces de activar MEK3/6 que a su vez catalizan las fosforilaciones concomitantes de una treonina/serina y un residuo de tirosina en las p38 MAPK. MEK6 activa las cuatro isoformas de p38 MAPK (Zarubin y Han, 2005).

La vía Ras/Raf/MEK/ERK MAP quinasa promueve la supervivencia celular mediante el bloqueo de NF- κ B, lo que aumenta la transcripción de genes anti-apoptóticos y pro-supervivencia como Bcl-2 y Mcl-1 (Balmanno y Cook, 2009).

b) ERK

Las ERK se asocian generalmente a la mitogénesis e inversamente con la apoptosis. La actividad sostenida de ERK se sabe que induce la muerte celular y tiene efectos anti-proliferativos (Cagnol y Chambard, 2010; Rodríguez-Berriguete y cols., 2012). La familia de quinastas activadas por señales extracelulares (ERK) está constituida por ERK1, ERK2, ERK3, ERK4 y ERK5. Esta familia está implicada en los procesos desencadenados por la llegada de los factores de crecimiento mitogénicos a la superficie celular. Principalmente, estos procesos son: control de la proliferación celular, supervivencia, diferenciación, motilidad y angiogénesis (Brunet y cols., 1998; McCubrey y cols., 2007; Akinleye y cols., 2013b). ERK1 y ERK2 tienen una amplia variedad de sustratos citosólicos y nucleares. La vía de señalización ERK1/2 promueve la progresión de las células de la fase G₀/G₁ a la fase S por activación de reguladores positivos del ciclo celular ciclina D1 y c-myc (Roovers y Assoian, 2000; Sears y cols., 2000). ERK1 y ERK2 tienen la secuencia TXY dentro de la región catalítica y son doblemente fosforilados por quinastas MEK1/2, mientras se encuentran en el citoplasma (Wilsbacher y cols., 1999; Sawhney y cols., 2009; Délérís y cols., 2011).

c) p38 MAPK

La MAP quinasa p38 se ha implicado en una amplia gama de procesos biológicos complejos. La mala regulación de los niveles de p38 MAPK en los pacientes está asociada con etapa avanzada y corta supervivencia en pacientes con cáncer de próstata, mama, vejiga, hígado y de pulmón (Koul y cols., 2013). p38 MAPK desempeña un doble papel como regulador de la muerte celular, ya sea mediante la supervivencia o muerte celular dependiendo del tipo de estímulo y el tipo de célula. Además, p38 MAPK es un actor importante en la modulación de la migración celular y la invasión.

La familia de p38 MAPK consta de cuatro isoformas p38MAPK α , p38MAPK β , p38MAPK γ y p38MAPK δ codificadas cada una por un gen separado, con diferencias en la especificidad de sustrato y distribución en los tejidos (Enslin y cols., 2000). Las cuatro formas se caracterizan por la presencia conservada de Thr-Gly-Tyr (TGY).

La vía de p38 se activa en respuesta a diferentes estímulos. Media en las vías que conducen a la apoptosis celular y señales de inhibición del crecimiento (Dong y cols., 2002; Kumar y cols., 2003).

p38 MAPK inhibe la progresión del ciclo celular en G₁/S y G₂ a través de la baja regulación de la expresión de ciclina D1 y Cdc25 (Bulavin y cols., 2003; Brancho y cols., 2003).

4 El Cáncer de próstata resistente a castración

Los andrógenos y receptores de andrógenos (RA) tienen papeles pleiotrópicos en la regulación del desarrollo de sexo masculino y la función normal del sistema urogenital masculino. El papel mejor definido para los RA es en el desarrollo y la regulación biológica de la glándula prostática (Chan y Dehm, 2014). La terapia de privación de andrógenos ADT (*Androgen deprivation therapy*) constituye la primera línea de tratamiento para el cáncer de próstata metastásico (Sharifi y cols., 2010). La disminución de andrógenos provoca la regresión del tumor, debido a su capacidad para inducir la apoptosis y la detención de la proliferación en las células del cáncer de próstata (Kahn y cols., 2014). A pesar de que los pacientes con enfermedad metastásica presentan una respuesta inicialmente nueva al tratamiento de ADT, en casi todos los pacientes se produce un aumento de los niveles circulantes de andrógenos en un tiempo medio de 2 a 3 años produciéndose la resistencia a castración (RC), lo que conlleva a la muerte en prácticamente todos los pacientes en 16-18 meses (Pienta y Bradley, 2006; Steinestel y cols., 2014; Lochrin y cols., 2015).

El cáncer de próstata refractario a las hormonas es el resultado de la regeneración de las células del cáncer de próstata que se han adaptado al entorno privado de andrógenos (Dutt y Allen, 2009). Tumores RC deben contener células cancerosas que sobreviven y proliferan a pesar de los bajos niveles circulantes de andrógenos tras la castración androgénica. Se han propuestos varios mecanismos para explicar la aparición de tumores ADT-resistentes, como son: (a) la regulación positiva de los receptores de andrógenos (RA), (b) las mutaciones de los RA, (c) aumento de la síntesis de andrógenos por las células tumorales, (d) la activación independiente de ligando de RA por factores de crecimiento o citoquinas, (e) los procesos RA-independientes provocados por mutaciones o señales extracelulares o (f) desarrollo de células tumorales con el apoyo de células madre de cáncer de próstata independientes de andrógenos (Felman y Felman, 2001; Pienta y Bradley, 2006; Ponguta y cols., 2008).

Se cree que las señales peptídicas autoparacrinan activan los receptores tirosina quinasa, contribuyendo a la aparición de RC. Este proceso se produciría mediante la activación de vías de señalización en las células del cáncer de próstata que eluden el requisito de andrógenos para sobrevivir y/o proliferar (Pienta y Bradley, 2006; Feldman y Feldman, 2001). Nuevas evidencias sugieren que la reactivación de los procesos de transición epitelio-mesenquimal EMT (*Epithelial mesenchymal transition*) pueden facilitar no solo el desarrollo de cáncer de próstata, sino también las metástasis del cáncer de próstata. EMT se caracteriza por el aumento de las características mesenquimales y la invasividad acompañados por la pérdida de la polaridad celular, progresión del tumor y la resistencia terapéutica (Kahn y cols., 2014). Por otro lado, esta resistencia a los andrógenos conduce a

un aumento en la producción de TGF- β , que a su vez promueve el crecimiento del cáncer de próstata, la viabilidad y la agresividad (Steiner y Barrack, 1992). La resistencia adquirida también puede desarrollarse como resultado de alteraciones en genes como p27 (represión), ciclina D1 (inducción), p53 y Rb (mutaciones) o a través de alteraciones en otras vías, como Akt/mTOR (Ananth y cols., 1999, Slingerland y Pagano, 2000; Zeng y cols., 2004).

5 Rutas de señalización involucradas en el cáncer de próstata

5.1 Vía de transducción NF- κ B/ATF/AP-1/Elk-1

La ruta de transducción de NF- κ B puede ser activada por señales proinflamatorias cuya activación puede estar mediada por la IL-1 al unirse a su receptor (IL-1RI) (Figura 12). Esta unión permite interactuar con una serina -treonina quinasa PAK-1 que se activa mediante la interacción con Rac y Cdc 42 (Feng y cols., 2009). PAK-1 activada fosforila y activa a p38 MAPK. Dependiendo del estímulo y tipo de célula, p38 puede fosforilar diferentes sustratos incluyendo factores de transcripción NF- κ B, ATF, AP-1, Elk-1 y varios miembros de la familia Bcl-2 (Zhao y cols., 1999; Royuela y cols., 2008; Whyte y cols., 2009). También p38 es capaz de activar la fosforilación de NF- κ B cuando es activado por citoquinas anti-inflamatorias como EGF al unirse a su receptor EGFR.

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) es un factor de transcripción que ha sido considerado el mediador central del proceso inflamatorio y la inmunidad innata, contribuyendo a importantes procesos intra y extracelulares. NF- κ B funciona como un homo o heterodímero de miembros de la familia Rel. Cada proteína Rel tiene una región conservada de 300 aminoácidos en N-terminal llamado dominio Rel (*Rel Homology Domain*) RHD esencial para la dimerización y la unión a elementos ADN afines (Caamaño y Hunter, 2002). La familia NF- κ B/Rel comprende cinco miembros de factores de transcripción: RelA (p65), Rel, c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105) y NF- κ B2 (p52/p100) (Hoesell y Schmid, 2013; Hinz y Scheidereit, 2014). Los factores de transcripción NF- κ B funcionales son dímeros formados por prácticamente cualquier combinación de los cinco miembros de la familia. Solo las unidades p65, c-Rel y Rel son las que se unen al ADN. NF- κ B1 y NF- κ B2 se sintetizan como moléculas precursoras, p150 y p100 respectivamente, las cuales tras experimentar un procesamiento proteolítico dan lugar a las formas maduras p50 y p52 (Yamamoto y Gaynor, 2001).

La activación de NF- κ B es frecuente en los carcinomas, donde su activación es impulsada principalmente por las citoquinas inflamatorias presentes en el microambiente tumoral (Di Donato y cols., 2012; Hoesell y Schmid, 2013). NF- κ B actúa de una manera específica

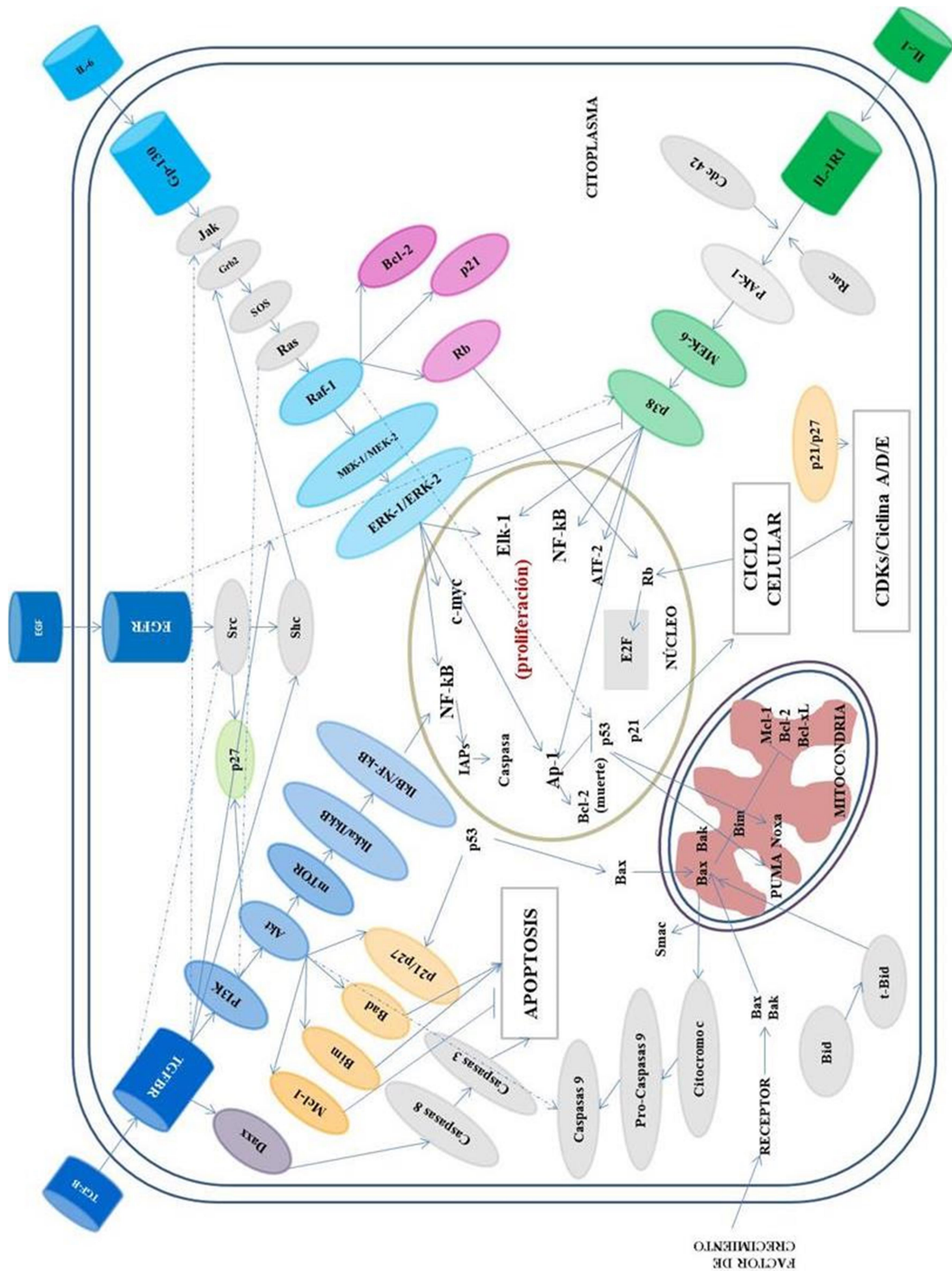


Figura 12. Rutas de señalización involucradas en el cáncer de próstata.

activando los genes de supervivencia dentro de la célula del cáncer y genes promotores de inflamación (Di Donato y cols., 2012).

Las ATF son factores activadores de la transcripción (*Activating Transcription Factor*) que pertenecen a la familia ATF/CREB. La familia ATF/CREB es un grupo de factores de transcripción que tienen diversas funciones en el control de la proliferación celular y la apoptosis (Persengiev y Green, 2003). La familia ATF/CREB se compone de 16 miembros basados en la similitud de secuencias, incluyendo el elemento vinculante de respuesta a AMPc (*cAMP response element binding protein*) CREB, CRE-BP1, ATF-2, entre otros (Lopez-Bergami y cols., 2010; Lau y Ronai, 2012). Todos ellos comparten el elemento b-ZIP. La región básica en este dominio es el responsable de la unión específica al ADN. Esta región básica contiene dos secuencias canónicas de localización nuclear (NLS) mientras que la región de cremallera de leucina contiene una secuencia de exportación (NES) que es la responsable de la formación de homodímeros o heterodímeros con otras proteínas que contienen b-ZIP (Hai y cols., 1988; Hai y cols., 2006; Vlahopoulos y cols., 2008). Las secuencias de localización nuclear (NLS) y la secuencia de exportación nuclear (NES) facilitan el tráfico de ATF-2 hacia y desde el núcleo (Liu y cols., 2006). ATF-2 también contiene una región en dedo de zinc N-terminal y un dominio de transactivación que regula su actividad transcripcional a través de una interacción intramolecular auto inhibitoria (Li y Green, 1996; Nagadoi y cols., 1999). La estabilidad de la proteína ATF-2 está regulada por ubiquitinación y degradación proteosomal.

ATF-2 puede formar dímeros o heterómeros con AP-1 a través del elemento b-ZIP y posteriormente unirse a elementos de respuesta a AMP cíclico (CRE; 5'-TGACGTCA-3') en DNA (Maekawa y cols., 1989; van Dam y Castellazzi, 2001; Maekawa y cols., 2010). ATF-2 se encuentra en la región cromosómica 2q32 y comprende 12 exones y tiene 505 aminoácidos (Ozawa y cols., 1991). ATF-2 es fosforilada y activada por proteínas quinasas activadas por estrés, como JNK, p38 o ERK con el fin de ser transcripcionalmente activa (Maekawa y cols., 1989; Maekawa y cols., 2010; Lau y Ronai, 2012). La heterodimerización de ATF con AP-1 parece ser crucial para al menos algunas de sus funciones. La subfamilia de ATF-2 contiene tres miembros; ATF-2, CRE-BPA y ATF-7 (Gaire y cols., 1990; Nomura y cols., 1993). ATF-2 es fosforilada en Thr69 y/o Thr71 en respuesta a estrés o citoquinas. TGF-B también induce fosforilación de APT-2 por p38 y p-ATF-2 interactúa con Smad3/Smad4 para activar sinérgicamente transcripción en respuesta a la estimulación de TGF-B (Sano y cols., 1999). La salida de la transcripción de ATF-2 es dictada por sus socios de dimerización que son predominantemente miembros de la familia AP-1 (Lau y Ronai, 2012).

Según la localización subcelular ATF-2 presenta funciones opuestas. La fosforilación de ATF-2 por la isoforma épsilon de la proteína quinasa C (PKC ϵ) controla la localización subcelular y la función de ATF-2 (Lau y Ronai, 2012). En el núcleo, ATF-2 contribuye a la

transcripción global y la respuesta al daño al ADN, además de las transcripciones específicas necesarias para cumplir con las funciones celulares de desarrollo, proliferación y muerte. En el citosol, ATF-2 deteriora el potencial de membrana mitocondrial y promueve la muerte celular.

Por la vía de EGF o TGF- β también se activa AP-1 (*Activator protein 1*). AP-1 está implicada en todas las áreas del comportamiento celular y se activa ante una gran cantidad de señales extracelulares de citoquinas y factores de crecimiento en respuesta al estrés y la inflamación (Angel y cols., 1987; Lee y cols., 1987; Eferl y Wagner, 2003).

La familia AP-1 de los factores de transcripción son homodímeros y heterodimérico compuesto por proteínas a partir de las familias Jun, Fos, ATF/CREB y la subfamilia de proteínas MAF. A diferencia de los miembros de la familia Jun (c-Jun, Jun-B, Jun-D), los miembros de la familia Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, Fos-B) necesitan heterodimerizar con miembros de la familia Jun para formar complejos transcripcionalmente activos (Angel y Karin, 1991; Kharman-Biz y cols., 2013). AP-1 a través de la proteína Jun presenta la capacidad de activar la transcripción de los genes que contienen elementos de respuesta TPA-sensible, caracterizados por la secuencia 5'-TGACGTCA-3' (Angel y cols., 1987; van Dam y Castellazzi, 2001). AP-1 se une al ADN por medio de una región de su secuencia rica en aminoácidos básicos, mientras que la estructura dimérica está formada por una cremallera de leucina. A través de estos dominios que la proteína AP-1 dimerizan y se une al ADN.

Numerosos estudios han demostrado la participación activa de la familia AP-1 en muchos tipos de cáncer incluyendo cáncer de mama, ovario, hígado, piel, hueso, pulmón y próstata (Uzzo y cols., 2006; Ye y cols., 2014).

El factor de transcripción Elk-1 [ETS (E twenty-six)-like 1] es un miembro representativo de la familia de proteínas ETS caracterizada por un dominio conservado ETS en el extremo N-terminal, estabilizado por tres residuos de triptófano clave y responsable de la interacción con el ADN (Mo y cols., 2000; Morris y cols., 2013). Un dominio central y un dominio de transactivación C-terminal. El dominio de activación de Elk-1 es importante para la ejecución de funciones fisiológicas (Morris y cols., 2013). La activación de Elk-1 es catalizada principalmente por MAPKs tales como ERK1/2. La fosforilación en Ser 383 sirve como un sello distintivo de la activación de ELK-1y regula diversos procesos importantes en la carcinogénesis mediante la regulación transcripcional en varias líneas celulares (Florkowska y cols., 2012; Morris y cols., 2013). La actividad transcripcional de Elk-1 da como resultado una amplia gama de funciones celulares normales incluyendo la adhesión célula-célula, célula-matriz, proliferación y apoptosis (Rao y Reddy, 1994; Li y cols., 2005).

5.2 Vía de EGF/IL-6

Los factores de crecimiento y mitogénos como EGF o TGF-B activan la ruta de transducción “*corriente abajo*” de los receptores tirosina-quinasa (Figura 12). En términos generales la señal se transporta mediante Src, Shc y Grb2. Grb2 se une con SOS (Lee y cols., 2007) y activa a Ras (una proteína G monomérica). Esta Ras activada estimula tres proteínas quinasa que actúan de forma secuencial Raf-1, MEK1/2 y ERK1/2 lo que resulta en la regulación del crecimiento y la diferenciación a través de la activación transcripcional de Elk-1, c-myc, ATF-2, AP-1 o NF-kB (Rao y Reddy, 1994; Li y cols., 2005). También podrían activarse mediante Jak (unión de IL-6/Gp-130) o PAK-1 (unión IL-1a/IL-1RI). Raf-1 es capaz de activar directamente a Bcl-2, p21 o Rb.

La familia de oncogenes Myc codifica el factor de transcripción de las proteínas N-myc, c-myc y L-myc que están implicados en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Cole y McMahon, 1999; Obaya y cols., 1999; Zhang y cols., 2010). Igualmente regula la expresión de genes implicados en procesos fisiológicos y apoptosis (Hoffman y Liebermann, 1998; Prendergast, 1999; Schrecengost y Knudsen, 2013) y también se expresan ampliamente en el desarrollo de órganos y tejidos en adultos, además de estar involucrados en la neoplasia (Zhang y cols., 2010). Uno de los objetivos de Myc es la adquisición de nutrientes para producir ATP, aumentar la masa celular, activar la replicación del ADN y la división celular (Stine y cols., 2015).

El oncogen c-myc se encuentra en la región cromosómica 8q24 (Zhang y cols., 2010), y al igual que los otros miembros de la familia es un factor de transcripción que dimeriza con Max para unirse al ADN y regular la expresión del gen (Conacci-Sorrell y cols., 2014). El gen c-myc sirve como un “regulador maestro” del metabolismo y el crecimiento celular (Miller y cols., 2012). Debido a su potencial oncogénico c-myc está estrechamente regulado en las células normales en muchos niveles (Levens, 2010). En su etapa post-transcripcional está regulado por los microARN y por la traducción de su ARNm (Sampson y cols., 2007; Lal y cols., 2009; Kim y cols., 2009a). Los posibles mecanismos propuestos para promover la regulación positiva de c-myc incluyen la amplificación del gen, la regulación de los potenciadores de largo alcance y la regulación positiva de la transcripción (Wang y cols., 2009; Sotelo y cols., 2010; Taylor y cols., 2010).

En términos generales c-myc posee un extremo N-terminal donde residen las funciones de transcripción (Dang y Lee, 1988; Cowling y cols., 2006; Conacci-Sorrell y cols., 2014). La región N-terminal contiene las regiones conservadas conocidas como cajas de myc (MBI, MBII) que participan en la actividad transcripcional. En el extremo C-terminal existe un dominio hélice-lazo-hélice (HLH) de unión al ADN, con una zona de carácter básico y una cremallera de leucinas (bHLHZ) de interacción con otras proteínas (Hu y cols., 2005; Follis y cols., 2009; Conacci-Sorrell y cols., 2014). Mediante este dominio myc se une la proteína

Max, generando el heterodímero Myc-Max (forma funcional de Myc) y un segmento medio rico en prolina, ácido glutámico, treonina y los residuos prolinas (Pest), así como dos cajas conservadas (MBIII y MBIV) y una secuencia de localización nuclear (Conacci-Sorrell y cols., 2014).

La proteína c-myc es modificada después de la traducción, ubiquitinizada y degradada con una vida media del orden de 15-20 minutos (Gregory y Hann, 2000; Gregory y cols., 2003). La actividad transcripcional de c-myc se ve afectada por microARN, siendo regulada por la fosforilación en Ser-62 seguido por Thr-58 y la posterior degradación proteosomal después de realizar su función (Salghetti y cols., 1999; Thomas y Tansey, 2011). Otra función de c-myc es la regulación del ciclo celular, no solo de forma indirecta a través del metabolismo, sino también de forma directa en la progresión del ciclo celular, en particular durante el punto de restricción de G₁, por la activación de genes como la ciclina D y CDK4 (Hermeking y cols., 2000; Beier y cols., 2000; Bretones y cols., 2015). Por otra parte, c-myc antagoniza la actividad de los inhibidores del ciclo celular como p21 y p27 a través de diferentes mecanismos. Por lo tanto, c-myc es capaz de bloquear la transcripción de p21 o inducir Skp2, una proteína implicada en la degradación de p27 (Bretones y cols., 2015).

La sobreexpresión de c-myc promueve la tumorigénesis mediante evasión de la apoptosis, la rotura del ADN, inestabilidad genómica y la migración celular, así como el escape del ciclo celular (Hermeking, 2003; Darcy y cols., 2009; Conacci-Sorrell y cols., 2014). A menudo c-myc se encuentra amplificado y con frecuencia regula positivamente el cáncer de próstata (Schrecengost y Knudsen, 2013).

5.3 Vía de transducción PI3K/Akt/mTOR

La vía de transducción PI3K/Akt/mTOR puede ser activada por factores reguladores y citoquinas anti-inflamatorias como TGF- β . TGF- β al unirse a su receptor es capaz de fosforilar y activar PI3K, esto conlleva la fosforilación de Akt y su consecuente activación, dando como resultado la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3), que normalmente aumenta la degradación de la ciclina D1 (Gao y cols., 2003; Gracia y cols., 2006). Además Akt es capaz de activar directamente p21 y p27, miembros de la familia Bcl-2 como son Bad, Bim y Mcl-1, y promover la activación del complejo I κ B quinasa (Ikk) para permitir la transducción de NF- κ B. En condiciones normales NF- κ B se encuentra retenido en el citoplasma junto con I κ B (inhibidor del factor- κ B) formando un complejo I κ B/NF- κ B (Beg y Baltimore, 1996; Palkowitsch y cols., 2008). Para que se produzca la activación de NF- κ B es necesario la fosforilación de I κ B por la quinasa Ikk produciendo la separación del complejo, NF- κ B penetra el núcleo actuando de factor de transcripción.

PI3K es una familia de quinasas de lípidos cuyos componentes integran las señales de factores de crecimiento tirosina quinasas (RTKs). PI3Ks transmiten señales desde la superficie celular al citoplasma mediante la generación de segundos mensajeros que a su

vez activan múltiples vías de efector quinasa (Akinleye y cols., 2013a). Se conocen ocho enzimas PI3K siendo las más importantes en el cáncer son las cuatro enzimas de clase I, denominadas PI3K α , PI3K β , PI3K γ y PI3K δ . PI3K es un heterodímero que consiste en una subunidad reguladora, p85, y una subunidad catalítica, p110. La fosforilación de la subunidad p85 conduce a un cambio conformacional de dicha proteína que conduce a la unión de la subunidad catalítica (p110). La PI3K activa, fosforila el fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2) convirtiéndolo en el segundo mensajero fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), el cual, corriente abajo, conduce a la activación de la proteína Akt (Cheaib y cols., 2015).

La proteína Akt es un importante mediador de la señalización de supervivencia celular por la supresión de la apoptosis, la modulación de la captación de glucosa y el metabolismo celular, interviniendo también en el crecimiento, proliferación y progresión del ciclo celular (Vivanco y Sawyers, 2002; Brazil y cols., 2004). La familia de Akt comprende tres serina-treonina quinasa altamente homólogas (Akt1, Akt2 y Akt3) que son codificadas respectivamente por los genes PKB, PKB β , y PKB γ . Cada miembro de la familia Akt contiene un dominio N-terminal homólogo a pleckstrin (PH) que ofrece sitios de unión para los fosfolípidos de membrana, y que está implicado en el reclutamiento de Akt a la membrana plasmática. También presenta un dominio central de quinasa y un dominio regulador carboxilo-terminal para proporcionar un sitio de acoplamiento para la activación de quinasa que contiene el motivo hidrófobo (HM) (Vivanco y Sawyers, 2002; Liao y Hung, 2010; Chong y cols., 2012).

Akt ejerce su actividad anti-apoptótica mediante la prevención de la liberación del citocromo c de la mitocondria y la inactivación de los factores de transcripción. Akt puede regular mediante la fosforilación e inactivación de Bad, que controla la liberación de citocromo c de la mitocondria, e inhibe la actividad de la caspasa-9 (Datta y cols., 1997; Fresno y cols., 2004; Li y cols., 2012). La activación de Akt se ha relacionado con la activación de la transcripción del gen anti-apoptótico survivin, un miembro de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) y tiene la capacidad de inhibir la caspasa-3, caspasa-7 y caspasa-9. Su sobreexpresión conduce a la resistencia a la apoptosis causada por diversos estímulos. PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) que sirve como un regulador negativo de Akt, es un potente supresor de tumores, por lo que la sobreexpresión de PTEN inhibe la fosforilación y activación de Akt por la desfosforilación de PIP3 que se convierte de nuevo a PIP2.

El efector clave de Akt es mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), una serina-treonina quinasa de 289 kDa. En las células normales, mTOR controla la homeostasis y contribuye al adecuado funcionamiento de la célula. La proteína mTOR forma dos complejos de múltiples subunidades distintas: mTORC1 que controla el crecimiento autónomo de la célula en respuesta a factores de disponibilidad y mTORC2 que media la proliferación

celular y la supervivencia (Moschetta y cols., 2014). MTORC1 es sensible a rapamicina y se define por su interacción con la proteína Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*). Es activado por factores de crecimiento, nutrientes, señales de energía, estrés, por las vías PI3K/Akt y Ras/MAPK. Se inhibe por el complejo TSC1/TSC2, importante regulador de la biogénesis ribosomal y síntesis de proteínas. MTORC1 activa S6K1 y 4EBP1 que están implicados en la traducción del ARNm (Hay y Sonenberg, 2004; Clegg y cols., 2011; Moschetta y cols., 2014). MTORC2 es insensible a rapamicina, y se define por su interacción con Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*). Generalmente es insensible a nutrientes, señales de energía y media la proliferación celular y la supervivencia (Chong y cols., 2012; Moschetta y cols., 2014; Cheaib y cols., 2015). MTORC1 es conocido como regulador en la traducción de Mcl-1, lo que contribuye a la supervivencia mTORC1-dependiente (Mills y cols., 2008). MTORC2 influye principalmente en el citoesqueleto de actina, la determinación de la forma celular y la modulación de la motilidad celular (Hay y Sonenberg, 2004; Wullschleger y cols., 2006). Se desconoce si mTORC2 regula la expresión de Mcl-1.

La mala regulación de la vía de mTOR por amplificación o mutación de PI3K, pérdida de la función de PTEN o sobreexpresión de Akt, S6K1, 4EBP1 comunes en las alteraciones en los componentes de la vía de mTOR y tienen un papel importante en la progresión del tumor (Moschetta y cols., 2014).

6 Hipótesis y objetivos

HIPOTESIS DE PARTIDA

El cáncer de próstata es una enfermedad maligna en la que diversidad de factores etiopatológicos hace que todavía no sea posible prevenir su aparición. La patología está ampliamente distribuida entre la población masculina, de los cuales de un 30 a un 40% presentan evidencias histológicas aunque finalmente no lo desarrollen. Es necesario buscar factores predictivos que junto con el PSA ayuden a prevenir con mayor eficacia la aparición 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, 1995). En la regulación del ciclo celular, así como en los procesos de carcinogénesis participan citoquinas, quinasas, factores de transcripción, caspasas y sus inhibidores.

Se ha visto que todos estos procesos están influenciados tanto por citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1 y TNF- α) como anti-inflamatorias (EGF y TGF-B). Estas citoquinas podrían estar favoreciendo supervivencia a través de NF-kB. Este factor de transcripción actúa mediante la inducción de PSA, bloqueo de la expresión del receptor de andrógenos e induciendo quizás la transcripción de las IAPs (proteínas inhibidoras de la apoptosis) y consecuentemente, la inhibición de las rutas apoptóticas mediadas por caspasas (caspasa-3, -6, -7 y -8). La correlación de todos estos datos con el receptor de andrógenos, 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

Nos proponemos profundizar en el conocimiento de diferentes factores inducidos por TNF- α , IL-6, IL-1, EGF o TGF-B, mediante el factor de transcripción NF-kB, su implicación en procesos de muerte y supervivencia celular, así como su posible aplicación clínica. Por ello pretendemos:

1. Correlacionar aspectos clínicos de pacientes con cáncer de próstata como son los niveles de PSA (pre- y post- operatorio), expresión del receptor de andrógenos, márgenes quirúrgicos, grado Gleason, presencia de metástasis, situación de los márgenes quirúrgicos, recidivas y supervivencia (cáncer dependiente y total) del paciente a los cinco años de la prostatectomía con diferentes componentes de las rutas de apoptosis/supervivencia de TNF- α /IL-1/IL-6/EGF/TGF-B como son Ras, Raf-1, ERK, MEK-1/MEK-2/MEK-6, ERK-

1/ERK-2, NF-kB, IAPs (proteínas inhibidoras de apoptosis) y caspasas. Pretendemos encontrar algún factor pronóstico que nos permita predecir las posibles recidivas del paciente, la evolución del mismo tras la prostatectomía, la posible transformación en cánceres hormonosensible, así como encontrar un factor pronóstico de la evolución de la malignidad. Es posible que estos datos puedan servir para aumentar la especificidad en el diagnóstico del cáncer de próstata.

2. Estudiar la expresión proteica de diferentes participantes en la activación de NF-kB por p38 ERK (EGF, EGFR, Ras, Raf, MEK-1, MEK-2 y MEK-6) y productos de transcripción inducidos por NF-kB como las IAPs (IAP-1/2, survivin y XIAP) así como sus caspasas diana (caspasa-3, -6, -7 y -8) en próstata normal, hiperplasia benigna prostática, neoplasia intraepitelial y adenocarcinoma en diferentes grados Gleason. Se determinará también el estado activo o inactivo de estas proteínas en la próstata (normal, hiperplásica, neoplasia y cáncer) mediante detección de fosforilación por inmunoprecipitación o translocación al núcleo, según la proteína de la que se trate.

3. Determinar el posible efecto que desencadena la participación de ERK y p38 (tras el tratamiento con TGF-B, IL-1, EGF o IL-6) en líneas celulares prostáticas dependiente (LNCaP) e independiente (PC3) de andrógenos. Se determinará su carácter pro- o anti-apoptótico. El índice apoptótico y el de proliferación se cuantificarán por citometría de flujo y MTT (Metil tiazol tetrazolio).

II Materiales y Métodos

Estudio *in vivo*

1 Materiales

1.1 Muestras

Se utilizaron muestras humanas procedentes del Hospital Universitario Príncipe de Asturias (Alcalá de Henares, Madrid) obtenidas mediante resección transuretral, prostatectomía radical y autopsias. Estas muestras se diagnosticaron histológica y clínicamente en el servicio de Anatomía Patológica. Todos los procedimientos fueron examinados por el Comité Ético de la Universidad de Alcalá y del Hospital Príncipe de Asturias (2013/003/20130214). En este estudio se incluyeron un total de 166 muestras procedentes de: 20 próstatas histológicamente normales (PN) obtenidas de autopsias; 10 Biopsias diagnosticadas como “normales” y que antes de 10 años han desarrollado cáncer de próstata; 15 muestras diagnosticadas como PIN de alto grado; 35 próstatas provenientes de pacientes con hiperplasia benigna (HBP) que se obtuvieron por prostatectomías radicales y resecciones transuretrales; y 86 próstatas provenientes de pacientes con cáncer de próstata (CP). Ningún paciente recibió terapia hormonal antes de la cirugía ni habían desarrollado metástasis.

Las muestras suministradas por el hospital estaban incluidas en parafina. Además se nos suministraron varias muestras de tejido fresco que se congelaron en nitrógeno líquido a -80°C para las técnicas de Bradford y Western Blot.

Para los estudios de correlación entre los niveles proteicos de los componentes de las rutas se utilizaron las muestras de los 86 pacientes diagnosticados de cáncer de próstata que experimentaron prostatectomía radical como terapia definitiva entre 1992 y 1999. El cáncer de próstata fue detectado mediante el test del PSA AxSYM system (Abbott, IL) y examen rectal. El diagnóstico fue confirmado mediante la evaluación histológica de núcleos de biopsia transuretral por aguja. El análisis inmunohistoquímico se realizó sobre las muestras de prostatectomía.

1.2 Anticuerpos

Anticuerpos primarios empleados

Tablas resumen de anticuerpos primarios de conejo (Tablas 5.1), cabra (Tabla 5.2) y ratón (Tabla 5.3) usados en la inmunohistoquímica (IHQ) y Western Blot (WB), diluciones utilizadas y sus correspondientes pesos moleculares (Pm).

Anticuerpo Policlonal conejo	Casa comercial	IHQ	WB	Pm (kDa)
EGF	Santa Cruz ¹	1/50	1/250	±6
EGFR	Santa Cruz	1/75	1/250	170
TGF-B	Santa Cruz	1/200	1/1000	±15
TGFBRI	Santa Cruz	1/50	1/250	55
TGFBRII	Santa Cruz	1/100	1/500	50
IL-1a	Santa Cruz	1/50	1/150	18
IL-B	Santa Cruz	1/50	1/1000	40
IL-1RI	Santa Cruz	1/50	1/150	80
IL-6	Santa Cruz	1/100	1/500	30
Gp-130	Santa Cruz	1/100	1/250	130
p-AKT-Thr	Santa Cruz	1/50	1/250	62
p-AKT-Ser	Santa Cruz	1/50	1/250	62
PI3K	Santa Cruz	1/100	1/200	85
Mcl-1	Santa Cruz	1/25	1/250	40
Ikk	Santa Cruz	1/50	1/250	85
p-Ikk	Santa Cruz	1/25	1/250	85/87
ERK-1	Santa Cruz	1/50	1/250	44
p-MEK-1/2	Santa Cruz	1/50	1/250	45
c-IAP-2	Santa Cruz	1/25	1/250	68
Bim	Santa Cruz	1/50	1/200	19/21/24
MTOR	Santa Cruz	1/75	1/200	289
p-mTOR	Santa Cruz	1/75	1/200	220
p27	Santa Cruz	1/75	1/250	30

Tabla 5.1 Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos. Forma humana de la proteína. ¹ Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA.

Anticuerpo Policlonal cabra	Casa comercial	IHQ	WB	Pm (kDa)
IL-1Ra	Santa Cruz	1/150	1/150	17
Bad	Santa Cruz	1/25	1/250	20
IAP 1/2	Santa Cruz	1/100	1/100	70/68
MEK-6	Santa Cruz	1/75	1/200	37
Nova-2	Santa Cruz	1/50	1/200	48/75

Tabla 5.2 Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos. Forma humana de la proteína. ¹ Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA.

Anticuerpo Monoclonal ratón	Casa comercial	IHQ	WB	Pm (kDa)
IL-1RII	Santa Cruz	1/125	1/1000	68
IκB	Santa Cruz	1/75	1/250	37
pIκB	Santa Cruz	1/50	1/1000	37
Bcl-2	Santa Cruz	1/75	1/250	26
Bcl-xL	Santa Cruz	1/50	1/250	30
Bax	Santa Cruz	1/50	1/250	23
p21	Santa Cruz	1/25	1/250	21
c-Myc	Santa Cruz	1/25	1/250	67
ERK-2	Santa Cruz	1/50	1/250	42
p-ERK-1	Santa Cruz	1/25	1/1000	45
MEK-1	Santa Cruz	1/25	1/250	45
Raf-1	Santa Cruz	1/50	1/250	72-76
Rb	Santa Cruz	1/50	1/250	110
pRb	Santa Cruz	1/100	1/250	115
p38	Santa Cruz	1/50	1/1000	38
Ki67	Santa Cruz	1/75	1/1000	395/345
p-ELK-1	Santa Cruz	1/50	1/150	62
NF-κB p50	Santa Cruz	1/500	1/250	50
NF-κB p65	Santa Cruz	1/50	1/250	65
p-ATF-2	Santa Cruz	1/100	1/200	70
p53 mut	DAKO ²	---	1/1000	53
Ap-1	Santa Cruz	1/75	1/200	37
PUMA	Santa Cruz	1/100	1/1000	30
Actina	Amersham ³	1/200	1/10000	40

Tabla 5.3 Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos. Forma humana de la proteína. ¹ Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA. ²Dako, Barcelona. ³ Amersham, Buckinghamshire, UK.

Anticuerpos secundarios empleados

A continuación se presentan los anticuerpos secundarios usados en la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) y Western Blot (WB). Los anticuerpos secundarios usados para la IHQ están unidos a biotina, mientras que para WB se encuentran unidos a peroxidasa (Tabla 6).

Anticuerpo	Origen	Casa Comercial	IHQ [*]	WB ^o
Anti-ratón	Conejo	DAKO ²	1/250	1/4000
Anti-conejo	Ratón	DAKO	1/150	1/4000
Anti-cabra	Cerdo	DAKO	1/250	1/4000
Anti-conejo y ratón	Cabra	DAKO (SM802)	---	---

Tabla 6. Anticuerpos secundarios utilizados. Anticuerpos usados en inmunohistoquímica (IHQ) y Western Blot (WB). ²Dako, Barcelona, España. ^{*}Anticuerpos unidos a biotina. ^oAnticuerpos unidos a peroxidasa.

2. Métodos

2.1 Fijación e inclusión del tejido prostático humano

- a. Inmediatamente a su obtención las muestras fueron fijadas con una solución comercial de formol al 4% en tampón pH = 7 (Dako, Barcelona, España) durante 24 horas.
- b. Tras un lavado se procedió a la deshidratación introduciendo la muestra en baño de etanol de concentración creciente, de 1 h de duración cada uno:
Etanol 96° (X2) → Etanol 100° (X4)
- c. La muestra se sumergió en isoparafina (3 baños de 1h).
- d. La inclusión se realizó sumergiendo la muestra en tres baños de parafina sucesivos:
Parafina I (1h) → Parafina II (1h) → Parafina III (1h) → Parafina III (24 h)
- e. La pieza se introdujo en un molde adecuado a su tamaño, el cual se rellenó con parafina fundida. Para ello se utilizó una estación de parafina.
- f. El molde conteniendo la pieza se enfrió sobre una placa fría hasta su solidificación.

2.2 Extracción de proteínas de tejido prostático humano

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 de la siguiente forma:

- a. Se añadieron 200 µl de solución de homogenización por cada 100 mg de tejido fresco y se disgregó el tejido utilizando un homogenizador eléctrico.
- b. Tras incubar 30 min en el hielo, se centrifugó a 9500 g durante 30 min a 4°C, y se recuperó el sobrenadante (extracto proteico).

REACTIVO

Solución de homogeneización

Trizma base 1 M, pH 7.4

EDTA 1 mM

B-Mercaptoetanol

Inhibidores de proteasas y fosfatasa: ONa (10 mM), NaF (1 M), Iodoacetamida (1 M), PMSF (100 mM), Aprotinina (1 mg/ml) y Leupeptina (10 mg/ml).

2.3 Inmunohistoquímica (IHQ)

- a. Se realizaron cortes de 5 µm de espesor con microtomo a partir de los bloques de parafina donde se incluyeron las piezas de tejido.

- b. Las secciones se depositaron extendidas sobre la superficie de un baño de agua caliente para su estiramiento.
- c. Los cortes se recogieron sobre la superficie de portaobjetos, los cuales fueron previamente recubiertos con silano (Sigma-Aldrich, Madrid, España), que evita que el tejido se despegue.
- d. Las preparaciones se mantuvieron toda la noche en una estufa a 37°C para su secado.
- e. Para facilitar la desparafinación, las preparaciones se introducen en una estufa a 60°C durante 1 h.
- f. Las muestras se desparafinaron introduciéndolas en dos baños sucesivos de xileno de 15 min cada uno. Posteriormente se pasan por dos baños de etanol 100° de 10 min cada uno.
- g. Las secciones se incubaron con H₂O₂ al 3% en metanol durante 30 min, en agitación y a temperatura ambiente, para eliminar la actividad de la peroxidasa del tejido.
- h. Se lavaron las preparaciones en agua destilada (2 veces) y se sumergen en baños con tampón ácido (Tampón Citrato) o básico (Tampón EDTA), dependiendo del anticuerpo utilizado por 5 min a temperatura ambiente.
Tampón ácido: las preparaciones fueron sometidas a calor en una olla de presión convencional, en tampón citrato durante 5 minutos, para romper los enlaces covalentes formados entre las moléculas de tejido durante la fijación, desenmascarando así los epítomos. Al finalizar se enfrían a temperatura ambiente durante 10 min.
Tampón básico: las secciones posteriormente son mantenidas en estufa de 60°C durante 5 min. Posteriormente las secciones son sometidas a ebullición en olla por 35 min para romper los enlaces covalentes formados entre las moléculas de tejido durante la fijación, desenmascarando así los epítomos. Al finalizar se enfrían a temperatura ambiente durante 5 min.
- i. Se lavaron primero con agua destilada y luego con TBS en agitación. Nota: cuando se utiliza el anticuerpo secundario de ratón y conejo (DAKO 802) no hay necesidad de hacer el bloqueo.
- j. Para bloquear las uniones inespecíficas, las secciones fueron incubadas con *normal donkey serum* (NDS) (Chemicon Int., Temecula, California) al 3% en TBS durante 45 min, a temperatura ambiente.
- k. Se retiró el exceso de solución de bloqueo de las secciones y se añadió el anticuerpo primario diluido en TBS. Se incubaron a 37°C toda la noche en cámara húmeda.
- l. Se lavaron luego con TBS en agitación (Tampón ácido) y con solución de lavado en agitación (Tampón básico).
- m. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario, 1 h a temperatura ambiente.
- n. Tras lavar de nuevo con TBS o solución de lavado por 5 min, según el tampón ácido o básico, se hace un lavado con tampón acetato 0,1 M durante 5 min, tras lo cual se

añadió la solución de revelado usando diamino-benzidina con el método de intensificación de la enzima glucosa oxidasa. Cuando se observó una señal intensa al microscopio en los controles positivos, se detuvo la reacción sumergiendo las secciones en tampón acetato.

- o. Después de lavar con agua de grifo las secciones fueron deshidratadas mediante baños sucesivos en etanol de concentración creciente: Etanol 70° (10 seg) → Etanol 96° (3 min) → Etanol 100° (5 min) X 2.
- p. Las preparaciones se sumergen en dos baños de xilol de 15 min cada uno. Posteriormente se depositan dos gotas de Entellan (Merck, Darmstadt, Alemania) sobre un cubreobjeto y se deja caer sobre la preparación.

REACTIVOS

TBS 20X

Trizma base 121.10 g

NaCl 175.32 g

El pH se ajustó con HCl concentrado a 7.4, enrasado a 1L con agua destilada.

Tampón Citrato

En Vision™. FLEX Target Retrieval Solución, pH bajo. Código KM829. Casa comercial Dako.

Tampón acetato 0.2 M

Se tomaron 226 ml de solución de acetato sódico (0.2 M), 24 ml de solución de ácido acético y se añadió agua destilada hasta 500 ml. El pH final fue de 6.

Tampón EDTA

EnVision™. FLEX Target Retrieval Solución pH Alto. Tampón Tris/EDTA pH 9. Código K8004. Casa Comercial Dako.

Solución de revelado

Solución A

NH₄Ni 0.1825 g
Glucosa 0.015 g
CINH₄ 0.003 g

Solución B

Diaminobenzidina 3.175 mg en 3.75 ml de
agua destilada

Tampón acetato 0.2 M 3.75 ml

La solución se preparó A + B + 0.2 mg de glucosa oxidasa (Sigma-Aldrich, Madrid, España)

2.4 Western Blot

2.4.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976)

Este método de cuantificación de proteínas se basa en el cambio de absorbancia que experimenta el *Protein Assay Reagent* (Bio-Rad, Madrid, España) al unirse a las proteínas, pasando del color marrón a azul. Se utilizó para determinar la concentración proteica de los extractos con la finalidad de estandarizar la cantidad de proteínas analizadas por *Western Blot*.

- a. Para el cálculo de la concentración de la muestra es necesario una recta patrón a partir de la cual se obtiene la ecuación de la concentración proteica en función de la absorbancia. Para ello se diluyeron diferentes cantidades de albúmina sérica bovina (BSA) a partir de una solución madre de 200 µg/ml junto con el *Protein Assay Reagent*, como se indica en la tabla 7.

BSA [µg/ml]	µl BSA (200 µg/ml)	µl H ₂ O	<i>Protein Assay Reagent</i> (µl)
0	0	800	200
2	10	790	200
4	20	780	200
6	30	770	200
8	40	760	200
12	60	740	200
16	80	720	200

Tabla 7. Reactivos para la obtención de la curva patrón de BSA.

- b. Por otro lado, se mezclaron 2 µl del extracto proteico, 798 µl de H₂O destilada y 200 µl de *Protein Assay Reagent*.
- c. Después de incubar a temperatura ambiente durante 5 min, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

A partir del valor de absorbancia obtenida y teniendo en cuenta la ecuación de la recta patrón y la dilución, se obtuvo el valor de concentración proteica del extracto.

Se llevó a cabo siguiendo esencialmente el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970).

a) Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

El extracto proteico correspondiente a cada condición experimental (un volumen conteniendo 10-20 µg, dependiendo de la proteína a detectar y los anticuerpos utilizados; la misma cantidad para cada condición en cada experimento) se mezcló en un tubo Eppendorf con el mismo volumen de tampón de muestra 2X. Esta mezcla se calentó en un baño María

placa térmica durante 5 min a 100°C. Luego, se cargó el volumen de cada tubo en el correspondiente pocillo del gel de poliacrilamida, dispuesto en el sistema Mini-Protean de Bio-Rad (Madrid, España) (Figura 13A), en tampón de electroforesis. Así mismo, se cargaron en el gel los estándares de peso molecular Rainbow de Amersham (Buckinghamshire, Reino Unido). El gel se sometió a una corriente eléctrica de 80-120 V, para separar las proteínas según su peso molecular.

b) Transferencia

Las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF Immobilion-P (Millipore, Darmstad, Alemania) la cual fue previamente activada sumergiéndola en metanol durante 1 min. Para ello, la membrana, a modo de sándwich, se colocó sobre tres filtros whatman, sobre ella se dispuso el gel y encima otros tres filtros whatman. Todo ello se dispuso en la cubeta de transferencia humedecida con tampón de transferencia y se aplicó un amperaje de 75 mA durante 1-1,5 h.

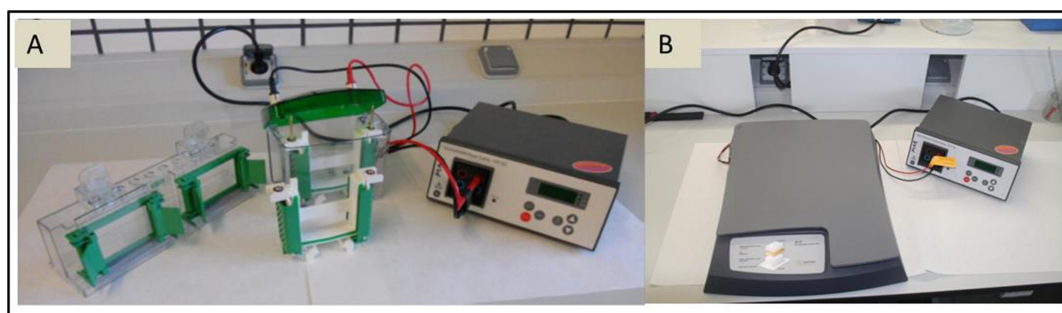


Figura 13. Sistema de electroforesis y transferencia. A A la derecha se muestra la fuente de alimentación (Power Supply EPS 301, Buckinghamshire, Reino Unido) y a la izquierda el soporte para la elaboración de los geles de poliacrilamida, la cubeta para la electroforesis. B. A la izquierda, la unidad de transferencia utilizada (T 77ECL Semy-dryTranferUnit, Amersham) y a la derecha la fuente de alimentación (Power Supply EPS 301, Buckinghamshire, Reino Unido) ambos del sistema Mini-Protean de Bio-Rad.

c) Inmunodetección

a. La membrana se incubo con solución de bloqueo para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo. La solución de bloqueo utilizada fue Tween-TBS (T-TBS) con un 5% de albúmina de suero bovino (Roche, Madrid, España) o leche desnatada en polvo, dependiendo si la proteína a detectar era fosforilada o no fosforilada, respectivamente, durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación.

b. Se incubó con el anticuerpo primario (Tablas 5.1, 5.2 y 5.3) en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C y en agitación.

c. Se lavó la membrana con T-TBS (3 veces x 5 min) y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Tabla 6), diluido en solución de bloqueo, durante 1 h a temperatura ambiente.

d. Se lavó de nuevo la membrana con T-TBS (3 veces x 5 min) y finalmente se reveló mediante el sistema *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) de acuerdo a las indicaciones del fabricante y utilizando placas radiográficas Agfa Curix RP2 Plus.

Como controles de carga se usaron anti β -actina, α -tubulina e histona 2A (H2A), en extractos totales, citoplásmicos y nucleares, respectivamente. La inmunodetección de estas proteínas se realizó sobre la membrana previamente utilizada para la detección de la/s proteína/s de interés, en ocasiones después de realizar *stripping*.

REACTIVOS

Geles de poliacrilamida

Gel separador	7.5 %	10 %	12 %	Gel concentrador	
H ₂ O destilada	4.85 ml	4.05 ml	3.35 ml	H ₂ O destilada	6.1 ml
Tris HCL 1,5M pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	Tris HCL 0,5M pH 6.8	2.5 ml
Acilamida/Bisacrilamida al 30%	2.5 ml	3.3 ml	4 ml	Acilamida/Bisacrilamida al 30%	1.3 ml
SDS al 10%	100 μ l	100 μ l	100 μ l	SDS al 10%	100 μ l
Persulfato amónico al 10%	100 μ l	100 μ l	100 μ l	Persulfato amónico al 10%	100 μ l
TEMED (tetrametilenodiamina)	10 μ l	10 μ l	10 μ l	TEMED (tetrametilenodiamina)	20 μ l

Tris Glicina-SDS Buffer Electroforesis Reactivo SIGMA

Tampón de muestra 2X

Tris HCl 65,2 mM pH 6.8
25 % de Gliserol
2 % de SDS

0.2 % de solución 10 mg/ml de azul de bromofenol en metanol
B-mercaptoetanol al 5 % v/v

Tampón de transferencia: Tampón de electroforesis con 20 % de metanol

TBS 10X

Tris 0.2 M
NaCl 1.37 M
pH ajustado a 7.6 con HCl

T-TBS

TBS 10X
Tween 20 al 0.1 %

2.5 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 “Olympus, SC100” y el programa de procesamiento de imágenes de Java en código abierto ImageJ inspirado por el NIH Image.

2.5.1 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.

2.5.2 Inmunohistoquímica

Se llevó a cabo una cuantificación histológica comparativa del inmunomarcaje al epitelio y estroma. Se utilizó el sistema de análisis de imagen acoplado a un microscopio óptico. El analizador está acoplado, a un microscopio Olympus Vanox-T AH-2 y el programa de procesamiento de imágenes de Java en código abierto ImageJ inspirado por el NIH Image. (Figura 14).

Para cada anticuerpo primario utilizado se tomó como “blanco” el valor cero correspondiente a la densidad óptica del control negativo. Luego, usando el ratón del ordenador se delimitaron al azar 5 áreas de superficie en cada una de las secciones positivas. La densidad óptica final fue determinada sustrayéndose al valor obtenido, el valor de la sección utilizada como control negativo. Con los promedios obtenidos para cada paciente se calculó la media \pm desviación típica de cada grupo de sujetos (próstata normal, HBP, PIN y cáncer).

2.5.3 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”. Además, se asignó a cada muestra una puntuación que integró el porcentaje de superficie teñida y la intensidad de la tinción y en concordancia, los pacientes fueron estatificados como “negativos”, “positivos bajos” y “positivos altos”.

2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa SPSS 20.0, tomando como significativas aquellas diferencias con un valor de $p < 0.05$ asociado.

a) Características clínico-patológicas estudiadas

Las variables clínico-patológicas incluidas en el estudio fueron: PSA sérico total preoperatorio, estadio T patológico (según el esquema TNM del AJCC/UICC de 2010 (Vallejos y cols., 2013), puntuación Gleason usando la modificada por la ISUP en 2005 (Epstein, 2005), implicación de ganglios linfáticos locales, invasión perineural, estatus de los márgenes quirúrgicos, supervivencia total y recurrencia bioquímica.

El principal criterio de valoración estudiado fue recurrencia bioquímica, definida ésta como la primera de dos o más elevaciones consecutivas en los niveles de PSA sérico total por encima de 0.2 ng/ml tras la prostatectomía radical.

Todas las variables se codificaron como ordinales. El PSA sérico preoperatorio, inicialmente codificado como variable cuantitativa continua, fue recodificada como variable ordinal según un umbral de 10 ng/ml, del cual se ha descrito ampliamente su utilidad pronóstica para la recurrencia bioquímica (Heidenreich y cols., 2011).

b) Estadísticos descriptivos

Para las variables cuantitativas continuas se estimó la mediana como medida de tendencia central y el rango como medida de dispersión. Para las variables cualitativas se estimó la frecuencia absoluta y el porcentaje.

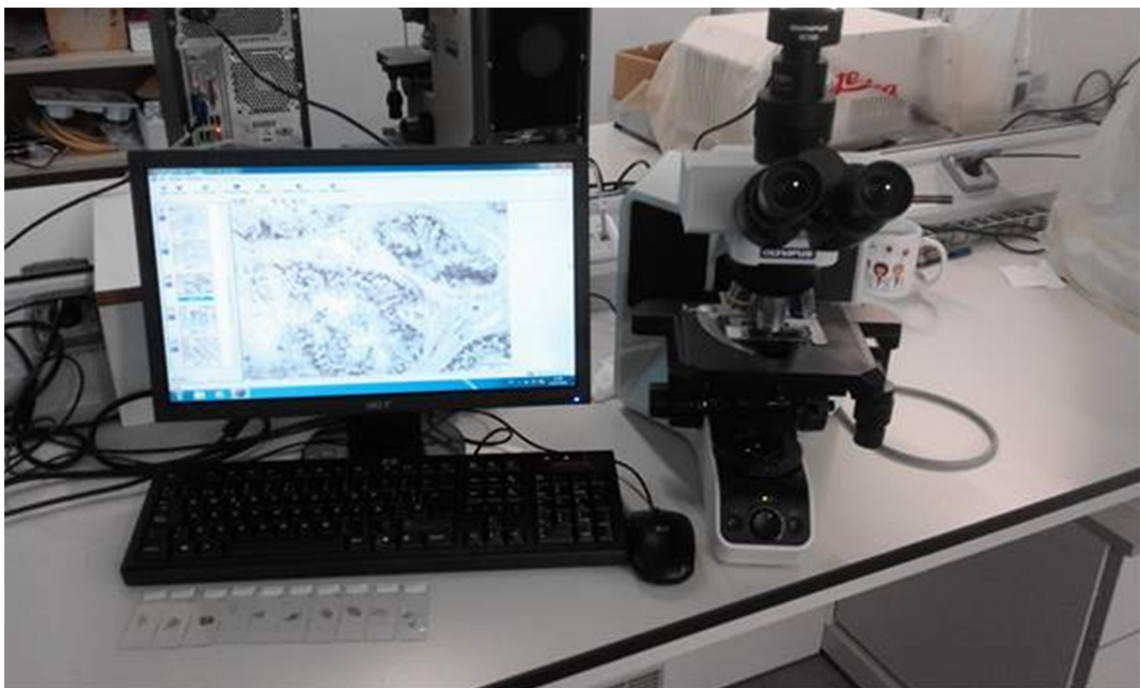


Figura 14. Microscopio óptico Olympus Vanox-T AH-2 acoplado a un sistema informatizado de análisis utilizado en el presente estudio.

c) Correlación de Spearman

La correlación de Spearman se utilizó para determinar el grado de relación lineal entre las variables ordinales. Proporciona un coeficiente de correlación (r), el cual mide tanto el grado como el sentido de correlación entre dos variables. Cuanto mayor sea el valor absoluto de r , que estará comprendido entre 0 y 1, mayor es el grado de correlación. Si el signo r es positivo la correlación entre las dos variables será directa y si es negativo, la correlación será inversa.

d) Análisis de supervivencia: definición del tiempo de seguimiento, curvas de Kaplan-Meier, *log-rank* y modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox.

El análisis de supervivencia es un método que permite estudiar el tiempo a una respuesta. Originalmente dicho método se aplicó al estudio de la muerte de los pacientes, de allí su nombre. En un análisis de supervivencia el tiempo de seguimiento viene definido por las fechas de inicio y cierre, las cuales son diferentes puesto que los pacientes ingresan en el estudio en momentos diferentes. Aquellos pacientes cuyo seguimiento termina antes de que se produzca el evento de interés se denominan pacientes censurados. El tiempo de seguimiento se define como el tiempo desde la inclusión del paciente en el estudio (fecha de diagnóstico, fecha de tratamiento, etc.) hasta la aparición del evento (muerte, aparición de recidiva, aparición de enfermedad, etc.).

En el presente estudio el tiempo de seguimiento se definió como el tiempo entre la prostatectomía radical y la aparición de recurrencia bioquímica (evento de interés) o la última visita del paciente (evento censurado).

Se utilizó el método de Kaplan-Meier para estimar las funciones de supervivencia. Dicho método permite representar la proporción acumulativa de pacientes que no experimentan el evento de interés en función del tiempo. Para verificar la igualdad o diferencia entre los tiempos se utilizó la prueba del *log-rank*.

Se usó el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox unifactorial para estudiar la asociación entre cada variable del estudio por separado y el evento de interés (tiempo de recurrencia bioquímica), mientras que su vertiente multifactorial se utilizó para estimar la relación entre las diferentes variables y el evento de interés, aislándolas de otras variables que también podrían ejercer un efecto sobre el mismo. El modelo de Cox proporciona la razón de riesgo instantáneo (HR, del inglés *hazard ratio*), la cual estima diferencias en el riesgo de experimentar el efecto de interés entre diferentes grupos de pacientes.

Estudio *in vitro*

3 Materiales

3.1 Líneas celulares

Los experimentos *in vitro* se llevaron a cabo sobre líneas celulares establecidas LNCaP (Figura 15A) y PC3 (Figura 15B) por ser líneas celulares de uso extendido en el ámbito de la investigación y por responder de diferente manera a los andrógenos. También se utilizó la líneas celular RWPE-1 (Figura 15C).

LNCaP: Fue aislada de una biopsia por aspiración con aguja de nódulo linfático supraclavicular de un hombre caucásico de 50 años con diagnóstico confirmado de carcinoma prostático metastásico. Son adherentes y crecen en respuesta a estimulación androgénica. Cultivadas con medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

PC3: Proviene de una metástasis de adenocarcinoma de próstata de grado IV en hueso de un hombre caucásico de 62 años. Son células adherentes y no responden a los andrógenos. Cultivadas con medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

RWPE-1: Son células epiteliales que proceden de la zona periférica de próstata humana de un adulto considerado histológicamente como normal. Cultivadas con medio enriquecido en queratinocitos (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU).

Las tres líneas celulares proceden de la American Type Culture Collection. La Figura 15 muestra micrografías de estas células.

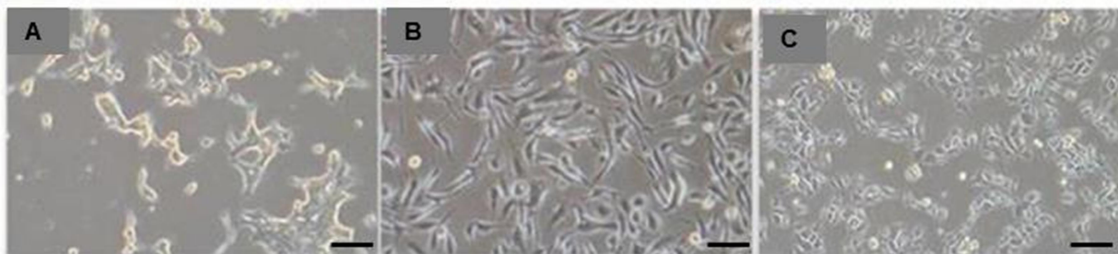


Figura. 15. Cultivos de las líneas celulares LNCaP (A), PC3 (B), RWPE (C). Micrografías tomada en microscopio óptico a 10X. Barra 20 μ m.

3.2 Citoquinas e inhibidores químicos

EGF, TGF-B y TNF-B recombinantes humanos se adquirieron liofilizados de Peprotech (París, Francia), se reconstituyeron en medio RPMI 1640 a una concentración de 10 μ g/ml y se almacenaron a -20°C .

Los inhibidores de p38, Ikk-B, MEK y ERK (Calbiochem, Darmstad, Alemania) fueron reconstituido a una concentración de 20 mM en DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Calbiochem) y fueron almacenados a -20°C (Tabla 8).

Diana	Nombre	Descripción
p38	SB203580	Inhibidor permeable a la membrana celular y altamente específico. No inhibe JNK o ERK, ni siquiera a una concentración de 100 μ M.
lkk-B	PS1145	Inhiben especialmente lkk-B, la quinasa principal responsable de la fosforilación de complejos lkb en la vía canónica de activación de NF-kB. Se ha descrito que no ejerce inhibición sobre otras quinastas <i>in vitro</i> a elevadas concentraciones (PKA, PKC, CK2, MEK1, p38, Lck, JNK y ERK2).
MEK	PD98059	Inhibidor permeable a la membrana celular. Es capaz de inhibir MEK y ERK, así como los sustratos que son fosforilados por esta MAPK.

Tabla 8. Inhibidores químicos utilizados en los experimentos *in vitro*.

4. Métodos

4.1 Mantenimiento y tratamiento de los cultivos celulares

Las células se cultivaron en flask de 250 ml, con 9 ml del medio de cultivo mencionado con antibiótico/antimicótico en ambos medios, en una atmósfera humidificada a 37°C y 5% de CO₂. El medio RPMI-1640 se suplementó con FBS (suero fetal bovino) al 10%. El medio enriquecido en queratinocitos se suplementó con EGF humano recombinante y extracto de pituitaria de bovino (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU).

El medio fue remplazado por medio fresco generalmente cada dos o tres días. Las células se despegaban del sustrato por tripsinización y para así poder realizar el subcultivo. Para los subcultivos en flask se colocaron para LNCaP 0.3×10^5 , PC-3 0.1×10^5 y RWPE-1 0.3×10^5 .

Los tratamientos se iniciaron 24 h después de la siembra, para permitir que las células se adhirieran al sustrato y asegurar el crecimiento exponencial.

Para medir el efecto de la privación de andrógenos en el momento de aplicar el tratamiento se retiró el medio, para de esta manera lavar los pocillos con tampón fosfato solución salina (PBS). Una vez realizado se añadió medio, el cual contenía un 10% de carbón sin FBS (CS-FBS). Mediante el empleo de CS-FBS se conseguía la simulación de la retirada de andrógenos, aplicando o no EGF. En algunos experimentos los tres inhibidores fueron aplicados 4 horas antes de los tratamientos. El medio se retiró y se reemplazó con medio fresco, el cual contenía los tratamientos.

4.2 Ensayo del MTT

El ensayo del MTT permite estimar de manera indirecta y relativa el tamaño de una población celular viable. El MTT en su forma soluble oxidada es de color amarillo. La carga positiva de su anillo tetrazolio permite su paso a través de la membrana plasmática y mitocondrial de las células viables, vía potencial de membrana. En este momento, reducido por las NAD(P)H-oxidoreductasas intracelulares, forman unos cristales de color azul. Dichos cristales son insolubles en agua (Berridge y cols., 2005).

El protocolo seguido fue el siguiente:

- a. Por cada condición experimental se sembraron células en los pocillos de una placa de 96 pocillos (superficie/pocillo = 0.32 cm^2). Se colocaron para LNCaP 0.12×10^5 , PC-3 0.006×10^5 y RWPE-1 0.18×10^5 .
- b. Tras 48 horas se retiró el medio cuidadosamente con una pipeta Pasteur y se añadieron $100 \mu\text{l}$ /pocillo de solución de MTT 5 mg/ml (Sigma-Aldrich, Madrid, España) al 5% en medio sin suero y sin rojo de fenol.
- c. Se incubó en una estufa humificada a 37°C y 5% de CO_2 , hasta que la formación de cristales en el interior celular fuese evidente al microscopio, generalmente durante 3 h.
- d. Se retira el medio y se añadieron $80 \mu\text{l}$ de DMSO en cada pocillo para disolver los cristales de formazán.
- e. Para determinar la cantidad de células viables por cada condición experimental se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en un espectrómetro de placas Multiskan Bichromatick (Labsystems, Midland, ON, Canada).

4.3 Determinación de muerte celular y de apoptosis/distribución del ciclo celular

Por cada condición experimental se sembraron células en cada pocillo de una placa de 6 pocillos (superficie/pocillo = 9.6 cm^2). Para las LNCaP se sembraron 6×10^5 , PC-3 3×10^5 y RWPE-1 9×10^5 células por pocillo.

Una vez finalizado el tratamiento:

- a. Se pasó el medio de cada pocillo a un tubo de citometría. Los tubos se mantuvieron en hielo durante todo el proceso.
- b. Tras un lavado se levantaron las células por tripsinización.
- c. Se recuperaron con PBS frío.
- d. Después se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, el sobrenadante fue descartado.
- e. El precipitado se resuspendió cuidadosamente en $800 \mu\text{l}$ de PBS y se repartieron $400 \mu\text{l}$ en dos tubos de citometría, uno para la determinación de muerte celular y otro para la determinación de apoptosis/distribución de las fases del ciclo celular.

4.3.1 Determinación de muerte celular (ensayo de viabilidad)

- a. Se añadieron $10 \mu\text{l}$ de yoduro de propidio (IP) 1 mg/ml e inmediatamente se realizó la medición con citómetro FACScalibur (Bekton Dickinson, Madrid, España).

La rotura de la membrana es un distintivo inequívoco de cualquier tipo de muerte celular que puede ser definida por la incorporación de tinciones vitales, como el IP, al interior celular (Kroemer y cols., 2009). En base a ello, se consideraron células muertas aquellas células positivas para IP.

4.3.2 Determinación de la apoptosis/distribución de las fases del ciclo celular

- Se añadieron 40 μ l de Nonidet P (NP)-40 al 1%, 3 μ l de RNasa (10 ng/ml).
- Se incubaron durante 30 min.
- Se añadieron 10 μ l de IP (1 mg/ml).
- Se realizó la medición en el citómetro de flujo.

Con esta técnica se obtienen unos histogramas de distribución de las células según su cantidad relativa de ADN, pudiéndose distinguir la proporción de células apoptóticas (sub-G₀/G₁), o en fase del ciclo celular G₀/G₁, S o G₂/M (Figura 16).

Todos los análisis de citometría de flujo fueron realizados con el programa informático Cyflogic v.1.2.1. (CuFlo Ltd, Turki, Finland).

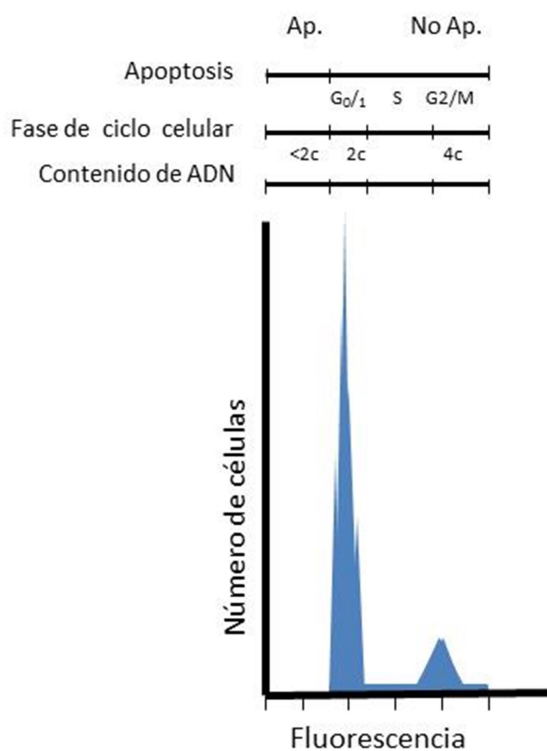


Figura 16. Histograma que muestra la distribución de una población celular de acuerdo a su contenido en DNA. En la figura se indica el contenido en DNA, la fase del ciclo celular y el carácter apoptótico de cada una de las fracciones celulares. Abreviaturas: Ap.: células apoptóticas; No Ap.: células no apoptóticas.

III Resultados

1. Estudio comparativo de la expresión de la vía de transducción IL-1/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 en el estroma y tumor en próstata normal y patológica

1.1 Análisis por Western Blot de la vía de transducción IL-1/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 en próstata normal, HBP y cáncer de próstata

Mediante Western Blot se comprobó que la especificidad de todos los anticuerpos se correspondía con el peso molecular descrito por la casa comercial.

1.2 Análisis de la expresión de la vía de transducción IL-1/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 mediante inmunohistoquímica en próstata normal, HBP y cáncer de próstata

1.2.1 Activación IL-1a y sus receptores

IL-1a:

No se observó expresión de IL-1a en PN (Figura 17A) y biopsias (Tabla 9). En HBP (Figura 17B) la inmunohistoquímica fue negativa en el estroma, no así en las células del epitelio glandular, donde el 77.1% de las muestras presentaron baja señal. En PIN hubo expresión solo en las células del epitelio glandular. En cáncer (Figura 17C) se acentúa la expresión, así como el número de las muestras positivas (94.2%). De las muestras positivas para IL-1a el 64.2% de los pacientes tenían un PSA > 10.0 ng/ml.

IL-1B:

La inmunotinción fue positiva en el citoplasma de las células epiteliales en todos los grupos. En PN (Figura 17D) y HBP el número de muestras positivas fue similar (cerca de 74%). En PIN el 100% de las muestras fueron positivas para IL-1B y presentaron similar expresión tanto en el epitelio como en el estroma. En cáncer (Figura 17E-F) la expresión disminuye significativamente en el epitelio glandular. Al evaluar la densidad óptica se encuentra que el grupo de mayor densidad óptica es HBP (Tabla 9).

IL-1RI:

El porcentaje de muestras positivas para IL-1RI disminuyó con la patología (Tabla 9). En PN (Figura 17G) y HBP no hubo expresión en las células del epitelio glandular. La inmunotinción destaca en el citoplasma de las células epiteliales en PIN y cáncer. La densidad óptica aumentó con la malignidad en el estroma siendo la más alta en las muestras

con cáncer (Figura 17H-I). De las muestras positivas para IL-1RI, 82.7% de los pacientes tenían un Gleason < 7.

IL-1RII:

En PN (Figura 17J) no hubo expresión para IL-1RII (Tabla 9), sin embargo, los porcentajes de muestras positivas se incrementaron con la patología. La expresión en HBP, PIN y cáncer fue en estroma y epitelio glandular. Las muestras de cáncer (Figura 17K-L) presentaron la densidad óptica más alta en las células del epitelio glandular. También encontramos inmunomarcaje en el citoplasma de las células del estroma. De las muestras positivas para IL-1RII el 74.4% no presento invasión perineural.

IL-1Ra:

En PN (Figura 17M) la expresión fue negativa para IL-1Ra (Tabla 9). El porcentaje de muestras positivas fue similar en PIN y cáncer (Figura 17N-O). En HBP, PIN y cáncer el marcaje apareció en el citoplasma celular tanto en estroma como epitelio. La densidad óptica disminuye con la malignidad en las células del epitelio glandular. En el estroma es similar la expresión entre PIN y cáncer aunque el valor disminuye a la mitad en HBP. De las muestras positivas para este marcador, el 40.66% tenían márgenes quirúrgicos positivos.

	IL-1a			IL-1B		
	% (n) Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.
PN	0	-----	-----	75.0 (15)	36.56±1.59 ^a	36.59±2.3 [#]
HBP	77.1 (27)	20.89±1.19 ^a	-----	73.5 (26)	55.41±2.23 ^b	58.83±3.3 [¥]
PIN	78.7 (12)	28.64±1.2 ^b	-----	100 (35)	52.88±3.4	52.43±3.4 [¥]
Cáncer	94.2 (81)	39.22±2.45 ^c	12.32±4.6	82.6 (71)	39.60±2.84 ^b	46.84±4.3 [§]
	IL-1RI			IL-1RII		
	% (n) Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.
PN	100 (20)	-----	8.52±1.62 [#]	0	-----	-----
HBP	79.3 (28)	-----	33.01±3.34 [¥]	41.9 (15)	28.27±2.15 ^a	13.91±1.51 [#]
PIN	73.3 (11)	13.42±4.3 ^a	36.06±3.9 [¥]	78.7 (12)	37.11±4.4 ^b	15.31±2.9 [#]
Cáncer	87.2 (75)	37.88±1.71 ^b	42.69±1.8 [§]	90.7 (78)	43.42±2.21 ^b	20.42±3.9 [¥]
	IL-1Ra					
	% (n) Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.			
PN	0	-----	-----			
HBP	40.0 (14)	35.41±2.23 ^a	8.36±2.1 [#]			
PIN	78.7 (12)	30.60±2.34 ^a	15.43±3.3 [¥]			
Cáncer	74.4 (64)	26.04±2.8 ^b	18.36±1.6 [¥]			

Tabla 9. Porcentaje de muestras positivas y densidad óptica de IL-1a, IL-1B, IL-1RI, IL-1RII e IL-1Ra. En próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media ± desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

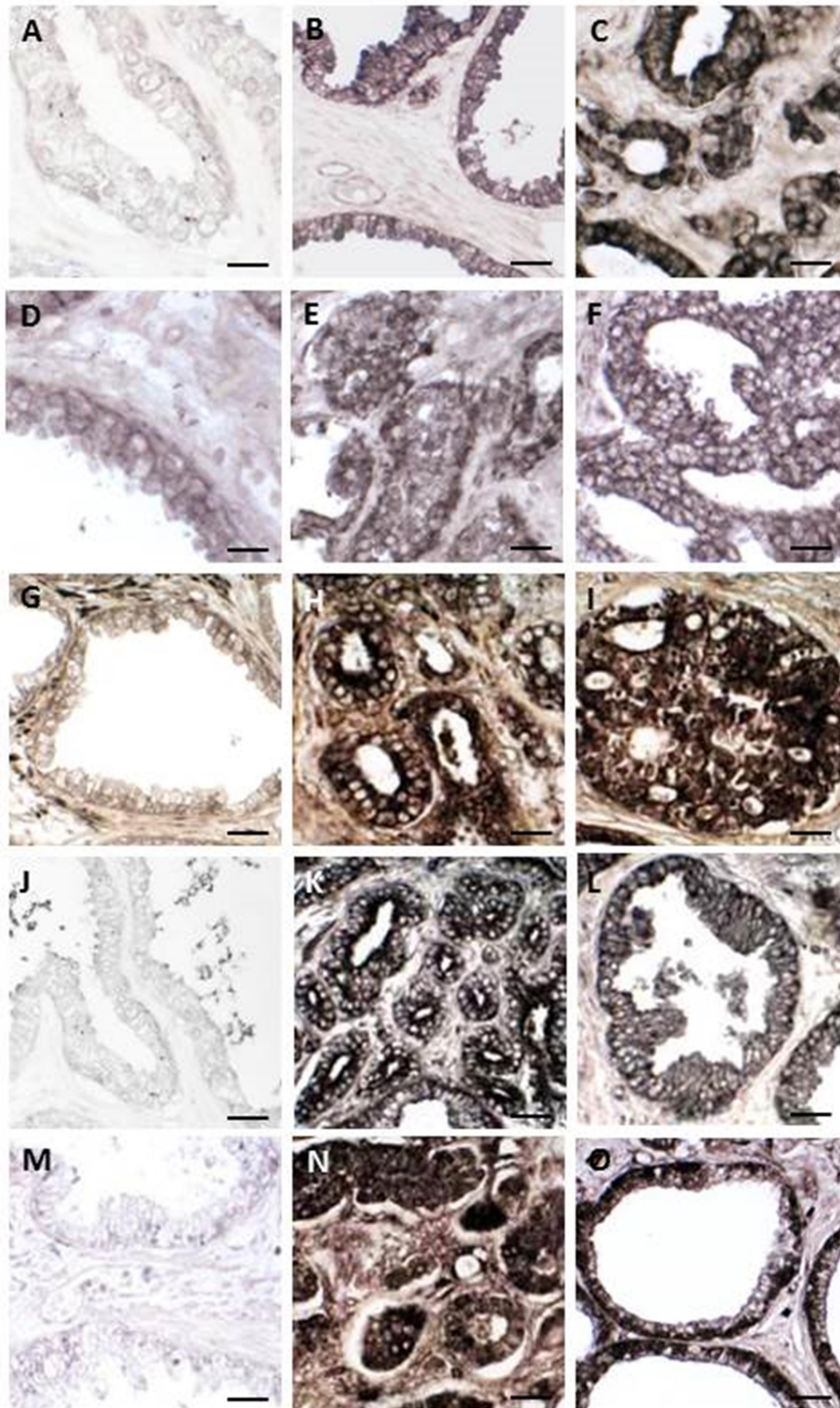


Figura 17. Expresión de IL-1a (A-C), IL-1b (D-F), IL-1RI (G-I), IL-1RII (J-L) e IL-1Ra (M-O), en próstata normal (A, D, G, J, M), HBP (B) y cáncer (C, E, F, H, I, K, L, N, O). Barra: 20 μ m (A, D, L), 25 μ m (B-C, E-F, I-K, M-O) y 30 μ m (G-H).

1.2. 2 Activación MEK-6/p38

MEK-6:

El 100% de las PN fueron positivas para MEK-6, este porcentaje disminuye en PIN y es similar en HBP y cáncer. En PN (Figura 18A) y HBP (Figura 18B) la señal se localizó en las células basales y en el citoplasma de las células epiteliales. En PIN (Figura 18C) y cáncer (Figura 18D) se observó un acentuado marcaje en el epitelio. En todos los grupos la densidad óptica fue superior en el epitelio glandular con respecto al estroma, incrementándose en PIN y cáncer (Tabla 10). De las muestras positivas para MEK-6, 34.1% de los pacientes presentaron progresión bioquímica.

p38:

En PN (Figura 18E), HBP, PIN (Figura 18F) y cáncer (Figura 18G-H) se observó marcaje de p38 tanto en el epitelio como en el estroma. En el epitelio el marcaje aumenta con la patología mientras que en el estroma ocurre lo contrario. La inmunotinción fue tenue destacando en la zona perinuclear. De las muestras positivas para p38, 34.4% de los pacientes tenían valores de PSA < 10.0 ng/ml.

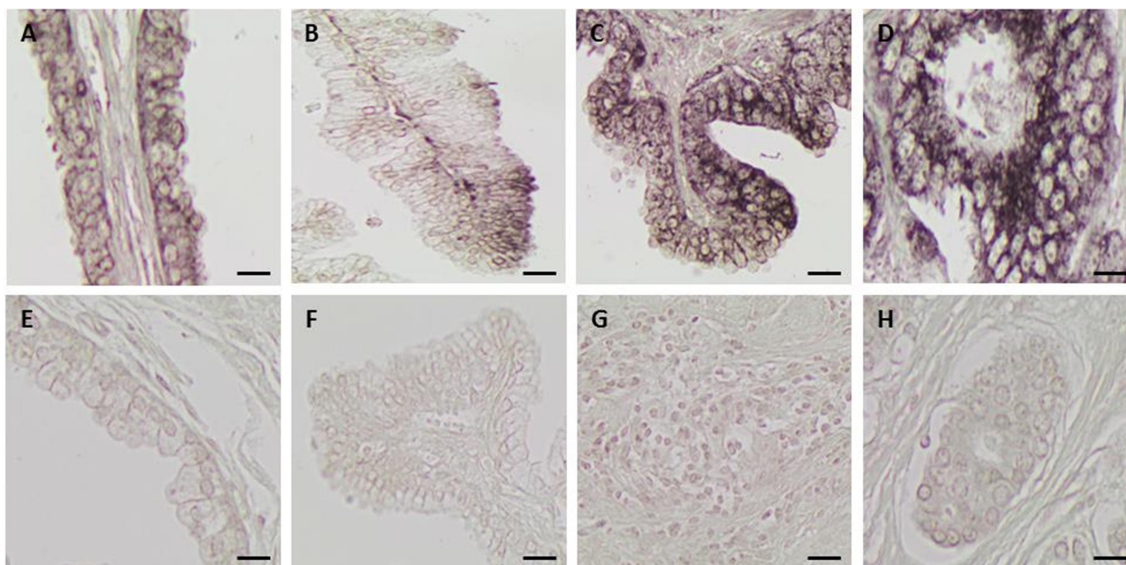


Figura 18. Expresión de MEK-6 (A-D) y p38 (E-H) en próstata normal (A, E), HBP (B), en PIN (C, F) y cáncer (D, G, H). Barra: 20 μ m (A-H).

	MEK-6			p38		
	% (n) Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.
PN	100 (20)	32.33 \pm 2.4 ^a	14.54 \pm 7.5	100 (20)	17.75 \pm 0.77 ^a	72.80 \pm 2.29
HBP	97.1 (34)	29.05 \pm 2.3 ^a	17.80 \pm 2.8	100 (35)	61.57 \pm 2.85 ^b	70.29 \pm 3.09
PIN	86.7 (13)	60.24 \pm 5.6 ^b	20.54 \pm 2.4	66.6 (10)	75.20 \pm 3.45 ^c	65.43 \pm 3.45
Cáncer	98.8 (85)	68.24 \pm 1.0 ^b	20.7 \pm 3.3	70.9 (61)	88.71 \pm 5.42 ^d	68.88 \pm 3.01

Tabla 10. Porcentaje de muestras positivas y densidad óptica de MEK-6 y p38 en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media \pm desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

1.2.3 Activación de los factores de transducción celular

NF-kB p50:

En muestras normales (autopsias o biopsias) (Figura 19A) y BPH (Figura 19B), NF-kB p50 apareció en el citoplasma de las células epiteliales y estromáticas. En todas las muestras de PIN (Figura 19C) y cáncer (Figura 19D) se expresó tanto en el citoplasma como en el núcleo. La densidad óptica en el citoplasma aumenta con la malignidad de la lesión, aunque en el núcleo es similar en cáncer y PIN (Tabla 11). De las muestras positivas para p50, 16.7% de los pacientes tenían Gleason ≥ 7 .

NF-kB p65:

En PN y biopsias se obtuvieron resultados negativos en citoplasma y núcleo para NF-kB p65 (Figura 19E). También fue negativo en el núcleo para HBP (Figura 19F) donde el 71.7% de las muestras fueron positivas en el citoplasma (Tabla 11). La densidad óptica en el citoplasma aumenta con la malignidad de la lesión, aunque en el núcleo no hay diferencia significativa entre PIN (Figura 19G) y cáncer (Figura 19H). De las muestras positivas para p65, 28.2% tenían invasión perineural.

p-Elk-1:

No hubo expresión en el citoplasma en PN para p-Elk-1 (Figura 19I) y se observó tenuemente en el núcleo de las células basales en el 100% de las muestras de PN. En HBP (Figura 19J), PIN (Figura 19K) y cáncer (Figura 19L) la inmunotinción apareció tanto en el citoplasma como en el núcleo. En el análisis estadístico se observó un aumento de la densidad óptica con la lesión. El 61.4% de las muestras positivas para p-Elk-1 no expresaron márgenes quirúrgicos positivos.

	NF-kB p50			NF-kB p65		
	% (n) Casos positivos	Citoplasma D.O.	Núcleo D.O.	% (n) Casos positivos	Citoplasma D.O.	Núcleo D.O.
PN	60.0 (12)	7.88 \pm 2.4 ^a	----	0	----	----
HBP	85.7 (30)	18.6 \pm 1.72 ^b	----	71.7 (25)	18.16 \pm 2.52 ^a	----
PIN	73.3 (11)	27.51 \pm 2.79 ^c	28.76 \pm 3.31	73.3 (11)	30.17 \pm 3.08 ^b	29.77 \pm 2.13
Cáncer	83.7 (72)	33.82 \pm 4.07 ^c	29.17 \pm 1.22	82.6 (71)	34.91 \pm 4.32 ^b	29.09 \pm 1.90
	p-Elk-1					
	% (n) Casos positivos	Citoplasma D.O.	Núcleo D.O.			
PN	100 (20)	----	2.4 \pm 0.92 [#]			
HBP	95.8 (34)	9.4 \pm 5.1 ^a	10.5 \pm 2.5 [¥]			
PIN	100 (15)	17.35 \pm 1.45 ^b	18.27 \pm 2.31 [§]			
Cáncer	81.4 (70)	19.6 \pm 5.6 ^b	17.23 \pm 3.5 ^{§c}			

Tabla 11. Porcentaje de muestras positivas y densidad óptica para NF-kB p50, NF-kB p65 y p-Elk-1 en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media \pm desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

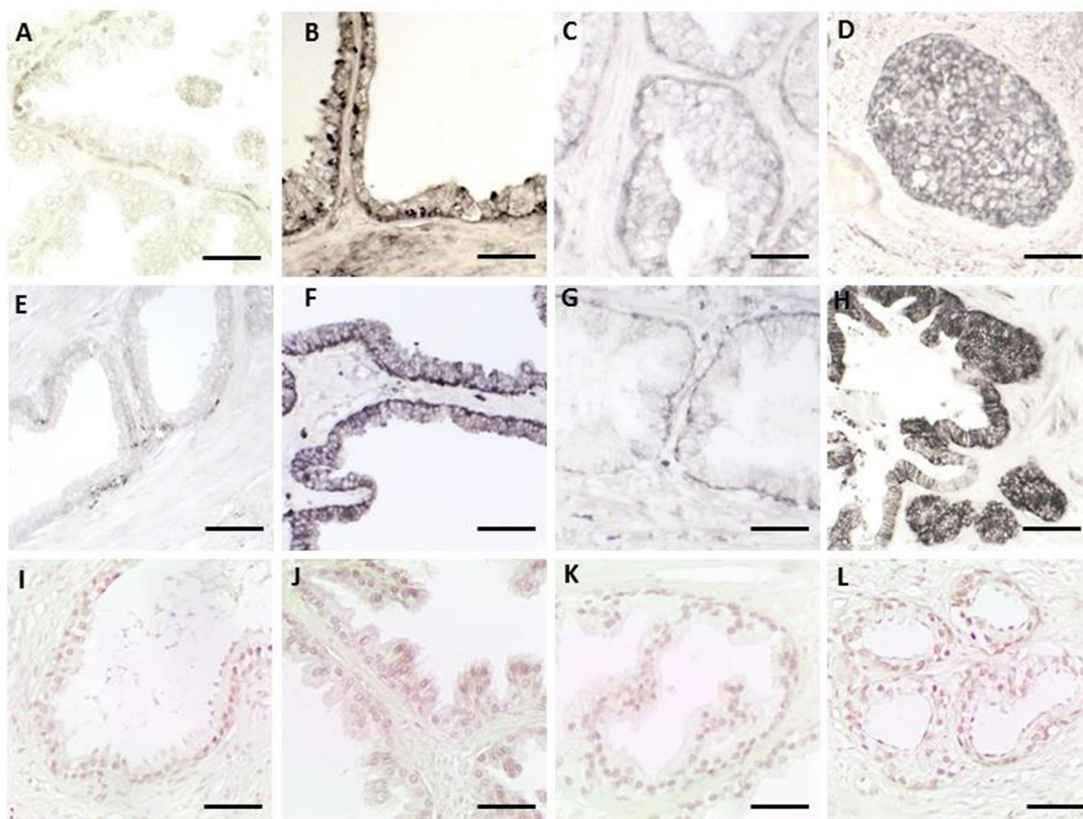


Figura 19. Expresión de NF-kB p50 (A-D), NF-kB p65 (E-H) y p-Elk-1 (I-L) en próstata normal (A, E, I), HBP (B, F, J), PIN (C, G, K) y cáncer (D, H, L). Barra: 20 μ m (B, C, G-J), 25 μ m (A, D-F, K, L).

p-ATF-2:

En PN y biopsias p-ATF-2 se expresó en el 100% de las muestras (Figura 20A) con una señal muy tenue en el citoplasma. En HBP (Figura 20B), 45.7% presento señal tenue en el núcleo de las células. En PIN el 100% de las muestras fueron positivas con expresión similar en núcleo y citoplasma. En cáncer (Figura 20C), 89.5% fueron positivas en el citoplasma y expresión un poco menor en el núcleo. La densidad óptica se incrementó con la malignidad, sin observarse diferencias entre PIN y cáncer en el citoplasma de las células (Tabla 12). De las muestras positivas para p-ATF-2, 35.4% de los pacientes presentaron progresión bioquímica.

Ap-1:

Las muestras de PN y biopsias fueron negativas para Ap-1. El porcentaje de muestras positivas aumentan significativamente con la patología (Tabla 12). En HBP (Figura 20D) el 100% de las muestras fueron positivas en las células basales. En PIN (Figura 20E) y cáncer (Figura 20F) la mayoría de las muestras fueron positivas en la región perinuclear de las células secretoras. La densidad óptica fue menor en PIN (Tabla 12). Del 91.9% de las muestras de cáncer positivas, el 63.3% de ellas tenían PSA > 10ng/ml.

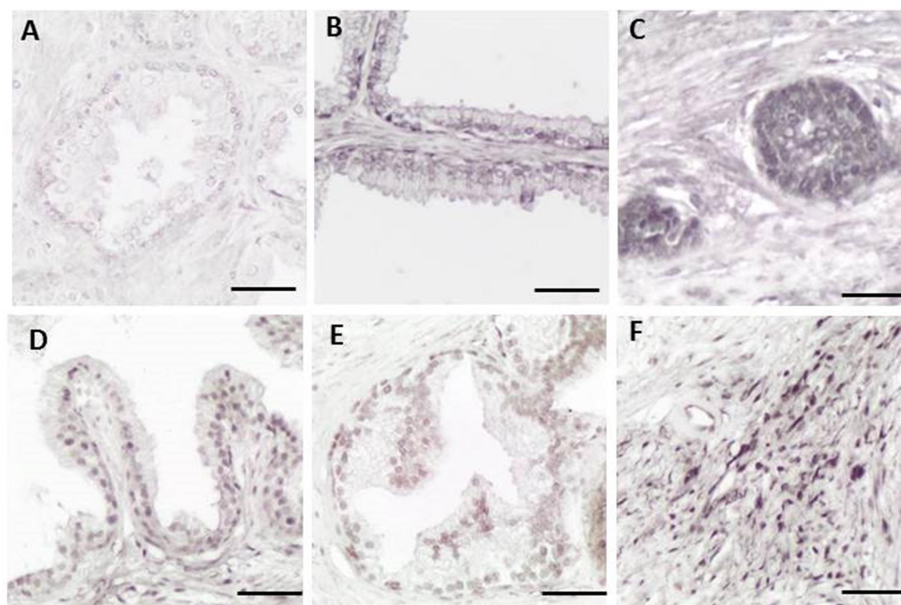


Figura 20. Expresión de p-ATF-2 (A-C) y Ap-1 (D-F), en próstata normal (A), HBP (B, D), PIN (E) y cáncer (C, F). Barra: 20 μ m (B, E, F), 25 μ m (A, C, D).

	p-ATF-2			Ap-1		
	% (n) Casos positivos	Citoplasma D.O.	Núcleo D.O.	% (n) Casos positivos	Citoplasma D.O.	Núcleo D.O.
PN	100 (20)	3.3 \pm 0.83 ^a	-----	0	-----	-----
HBP	45.7 (16)	-----	5.25 \pm 2.16 [#]	27.0 (9)	-----	39.8 \pm 4.4
PIN	100 (15)	13.35 \pm 1.78 ^b	12.31 \pm 4.21 [*]	86.6 (13)	25.3 \pm 3.4 ^a	-----
Cáncer	89.5 (77)	11.75 \pm 3.45 ^b	9.56 \pm 3.87 [*]	91.9 (79)	36.23 \pm 5.1 ^b	-----

Tabla 12. Porcentaje de muestras positivas y densidad óptica de p-ATF-2 y Ap-1 en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media \pm desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

1.2.4 Activación familia Bcl-2 y mp53

Bcl-2:

Bcl-2 se expresó débilmente en las células basales y estromáticas en PN (Figura 21A) y en biopsias. El porcentaje de muestras positivas es similar para PN y HBP (Figura 21B) sin embargo, aumentó considerablemente en PIN. En las muestras de cáncer (Figura 21C) y PIN se observó una fuerte reacción en una zona citoplasmática apical puntual (Figura 21D). La densidad óptica entre PIN y cáncer aumentó con la malignidad, pero no se encontraron diferencias significativas (Tabla 13). De las muestras positivas para Bcl-2, 85.0% de los pacientes mostraron Gleason < 7.

Bax:

En PN (Figura 21E) Bax se expresó en el 50% de las muestras en algunas células epiteliales. En HBP este patrón se mantuvo aunque aumentó el porcentaje de positivos. En

PIN (Figura 21F) y cáncer (Figura 21G) el número de muestras positivas y la densidad óptica fue similar entre ellas, pero mayor que la observada en PN e HBP (Tabla 13). De las muestras positivas para Bax, 38.1% no presentaron márgenes quirúrgicos.

	Bcl-2			Bax		
	% (n) Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.
PN	35.0 (7)	6.19±1.28 ^a	3.55±0.69 [#]	50.0 (10)	12.44±2.39 ^a	1.40±0.23 [#]
HBP	35.7 (17)	11.38±1.71 ^b	8.36±1.52 [*]	78.6 (26)	11.3±2.54 ^a	1.15±0.92 [#]
PIN	80.0 (12)	16.57±4.6 ^b	9.06±2.7 [*]	46.6 (7)	17.28±4.05 ^b	11.16±1.6 [*]
Cáncer	69.8 (60)	14.02±2.28 ^b	7.10±2.23 [*]	48.8 (42)	22.42±4.77 ^b	1.56±1.06 [#]

Tabla 13. Porcentaje de muestras positivas y densidad óptica de Bcl-2 y Bax en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media ± desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

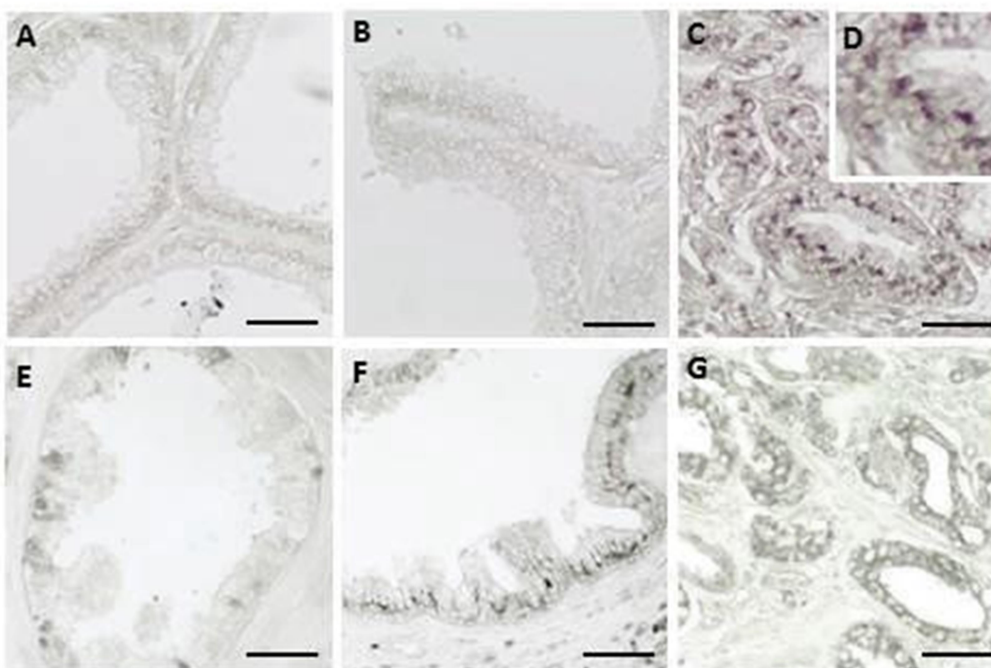


Figura 21. Expresión de Bcl-2 (A-D) y Bax (E, F, G) en próstata sin patología (A, E), HBP (B), PIN (F) y cáncer (C, D, G). Barra: 10 µm (D), 20 µm (C) y 25 µm (A, B, E, F, G).

PUMA:

En PN (Figura 22A), PIN y HBP (Figura 22B) se expresó en las células basales mientras que en cáncer (Figura 22C) se observa un marcaje homogéneo en el núcleo y el citoplasma de las células epiteliales. El 100% de las muestras fueron positivas en HBP y PIN (Tabla 14). No hubo diferencias en la densidad óptica entre los diferentes grupos estudiados. La densidad óptica aumento levemente con la patología en el epitelio y en el estroma.

Bcl-xL:

Las muestras de PN y PIN (Figura 22D) fueron todas positivas para Bcl-xL apareciendo el marcaje en los núcleos de las células epiteliales. En HBP destacan las células basales (Figura 22E). En cáncer (Figura 22F) se observó un marcaje similar. Las densidades ópticas fueron más altas en el epitelio que en el estroma en todos los grupos, no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio (Tabla 14).

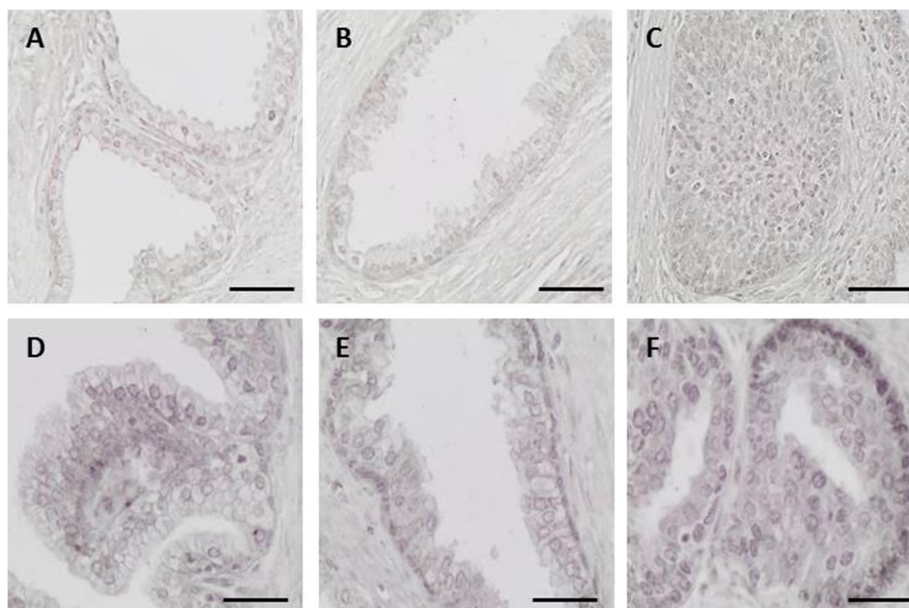


Figura 22. Expresión de PUMA (A-C) y Bcl-xL (D-F) en próstata normal (A), HBP (B, E), PIN (D) y cáncer (C, F). Barra: 20 μ m (D-F) y 30 μ m (A-C).

	PUMA			Bcl-xL		
	% (n) Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.
PN	75.0 (15)	13.40 \pm 1.7	9.67 \pm 1.4	100 (20)	21.77 \pm 3.91	12.74 \pm 2.51
HBP	100 (35)	16.70 \pm 0.9	10.7 \pm 0.7	97.1 (34)	20.37 \pm 3.22	15.01 \pm 2.18
PIN	100 (15)	16.80 \pm 2.9	11.0 \pm 2.2	100 (15)	24.51 \pm 3.04	14.01 \pm 1.41
Cáncer	90.7 (78)	17.90 \pm 1.9	11.8 \pm 1.7	96.5 (83)	19.19 \pm 2.82	12.01 \pm 0.93

Tabla 14. Porcentaje de muestras positivas y densidad óptica de PUMA y Bcl-xL en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media \pm desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

Nova:

La inmunotinción fue muy débil en todos los casos, siendo casi negativa en el estroma. Casi el 100% de las muestras fueron positivas en todos los grupos (Tabla 15). Los valores de la densidad óptica fueron bajos en PN e HBP (Figura 23A) con un leve aumento no significativo en PIN (Figura 23B) y cáncer (Figura 23C-D).

mp53:

El marcaje apareció en la zona perinuclear y en las células del estroma fue difuso. El 100% de las muestras de PN, HBP y PIN fueron positivas para mp53. En cáncer el porcentaje de muestras positivas disminuye (Tabla 15). La densidad óptica en PN (Figura 23E) fue baja, incrementándose levemente en el epitelio en HBP (Figura 23F), siendo similar en PIN (Figura 23G) y cáncer (Figura 23H). De las muestras positivas para mp53, 71.8% no presentaron invasión perineural.

	Nova			mp53		
	% (n) Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) Casos positivos	Citoplasma D.O.	Núcleo D.O.
PN	100 (20)	8.50±4.7	2.0±0.7	100 (20)	5.4±1.9 ^a	-----
HBP	97.1 (34)	8.13±0.8	1.7±1.0	100 (35)	12.47±3.4 ^b	4.87±2.7
PIN	100 (15)	10.7±1.3	2.5±1.5	100 (15)	20.12±3.4 ^c	5.83±3.4
Cáncer	96.5 (83)	9.08±1.8	2.8±0.4	90.7 (78)	21.43±3.8 ^c	6.42±1.9

Tabla 15. Porcentaje de muestras positivas y densidad óptica de Nova y mp53 en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media ± desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

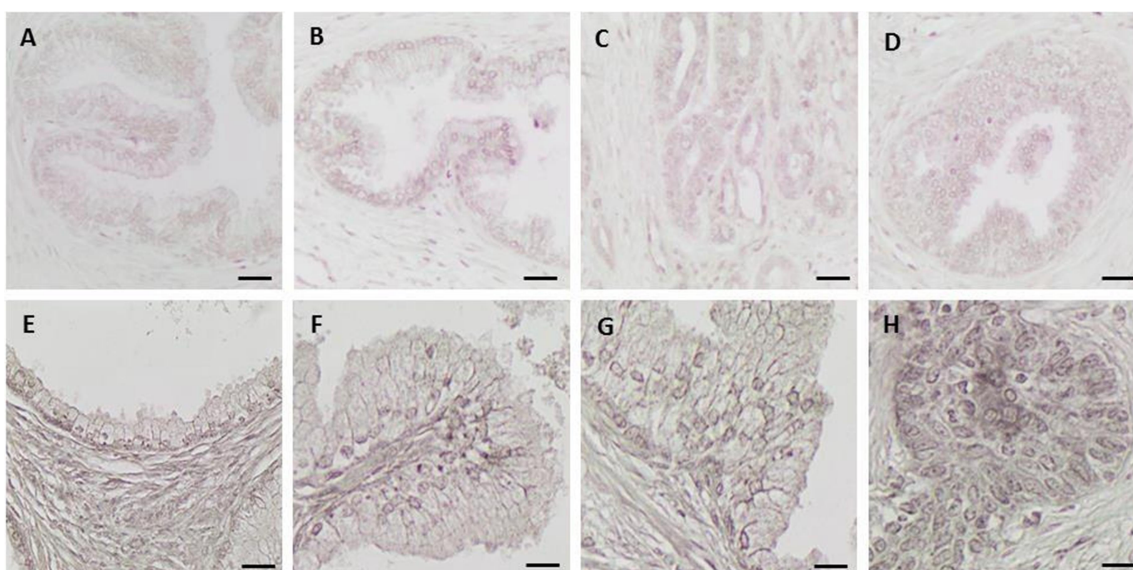


Figura 23. Expresión de Nova (A-D) y mp53 (E-H) en próstata normal (E), HBP (A, F), PIN (B, G) y cáncer (C, D, H). Barra: 20 μm (F-H) y 25 μm (A-E).

1.3 Proporción de pacientes con inmunotinción positiva para la vía de transducción IL-1/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 en el estroma y tumor en la cohorte estudiada

Se determinó el porcentaje de pacientes positivos en el estroma y tumor, mediante inmunohistoquímica, para cada uno de los factores estudiados. Se asignaron valores relativos a la intensidad de tinción positivos bajos y positivos altos (Tabla 16).

	Estroma			Tumor		
	Expresión	Intensidad		Expresión	Intensidad	
	Positivo % (n)	P bajo % (n)	P alto % (n)	Positivo % (n)	P bajo % (n)	P alto % (n)
IL-1a	87.2(75)	52.3(45)	34.9(30)	91.9(79)	5.8(5)	86.0(74)
IL-1B	77.9(67)	17.4(15)	60.6(52)	77.9(67)	8.1(7)	69.8(60)
IL-1RI	86.0(74)	24.4(21)	61.6(53)	82.6(71)	25.6(22)	57.0(49)
IL-1RII	87.2(75)	11.6(10)	75.6(65)	87.2(75)	4.7(4)	82.6(71)
IL-1Ra	61.6(53)	33.7(29)	27.9(24)	73.3(63)	18.6(16)	54.7(47)
MEK-6	98.8(85)	20.9(18)	77.9(67)	98.8(85)	3.5(3)	95.3 (82)
p38	51.2(44)	46.5(40)	4.7(4)	67.4(58)	50.0(43)	17.4(15)
NF-kB p50	80.2(69)	14.0(12)	66.3(57)	75.6(65)	25.6(22)	50.0(43)
NF-kB p65	74.4(64)	22.1(19)	52.3(45)	80.2(69)	4.7(4)	75.6(65)
p-Elk-1	69.8(60)	53.5(46)	16.3(14)	80.2(69)	46.5(40)	33.7(29)
p-ATF-2	89.5(77)	34.9(30)	54.7(47)	89.5(77)	22.1(19)	67.4(58)
Ap-1	91.9(79)	45.3(39)	46.5(40)	91.9(79)	15.1(13)	76.6(66)
Bcl-2	50.0(43)	31.4(27)	18.6(16)	61.6(53)	37.2(32)	24.4(21)
Bax	36.0(31)	25.6(22)	10.5(9)	46.5(40)	7.0(6)	39.5(34)
mp53	95.3(82)	22.1(19)	73.3(63)	90.7(78)	23.3(20)	67.4(53)
PUMA	87.2(75)	52.3(45)	34.9(30)	90.7(78)	27.9(24)	62.8(54)
Bcl-xL	69.8(60)	41.9(36)	27.9(24)	75.6(65)	37.2(32)	38.4(33)
Nova	96.5(83)	46.5(40)	50.0(43)	90.7(78)	29.1(25)	61.6(53)

Tabla 16. Distribución de la frecuencia de pacientes con inmunotinción positiva para la vía de transducción IL-1/p38/NF-kB/ATF-2/AP-1/Elk-1 según resultados de inmunohistoquímica. Se detallan los pacientes positivos y dentro de estos, aquellos con positivo bajo y positivo alto en cuanto a la intensidad del marcaje en el estroma y tumor.

1.4 Correlación entre la expresión en el estroma y tumor en los componentes de la vía de transducción IL-1/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 y las características clínico-patológicas de cáncer de próstata

Para la correlación de los componentes de la ruta de transducción IL-1a, Bcl-2 y los marcadores clásicos establecidos se realizó el test de Spearman. Se determinó el grado de relación entre las variables.

1.4.1 Correlación entre la expresión de la inmunohistoquímica en el estroma y los marcadores clásicos.

No se encontró ninguna asociación significativa de la expresión en el estroma para IL-1B, IL-1RI, IL-1RII, MEK-6, NF-kB p65, p-Elk-1, mp53, Bax, PUMA, Bcl-xL y Nova (Tabla 17). La correlación fue inversa entre la expresión positiva de IL-1a y p38 con la progresión bioquímica; entre p38 con la implicación de ganglios; entre NF-KB p50 con el estadio T

patológico, invasión perineural, márgenes quirúrgicos y supervivencia; y entre p-ATF-2 con la invasión perineural. Sin embargo, la relación fue directa entre el receptor antagonista IL-1Ra con la progresión bioquímica; entre Bcl-2 y AP-1 con el estadio T patológico; entre p-ATF-2 con el PSA preoperatorio; y entre Bcl-2 con los márgenes quirúrgicos.

	PSA sérico preoperatorio		Estadio T patológico		Estadio T clínico		Puntuación Gleason	
	r	p	r	p	r	p	r	p
IL-1a	0.148	0.175	-0.002	0.988	-0.001	0.994	0.075	0.490
IL-1B	0.067	0.539	-0.064	0.560	0.147	0.176	0.023	0.832
IL-1RI	0.047	0.666	-0.112	0.304	0.097	0.373	-0.080	0.463
IL-1RII	0.075	0.492	-0.142	0.194	0.069	0.527	0.175	0.107
IL-1Ra	0.055	0.615	0.027	0.804	0.094	0.387	0.109	0.319
MEK-6	-0.081	0.456	0.079	0.471	0.099	0.365	0.050	0.648
p38	0.042	0.703	0.021	0.845	0.002	0.984	-0.164	0.131
NF-kB p50	0.114	0.297	-0.268	0.012	-0.017	0.876	-0.080	0.466
NF-kB p65	-0.052	0.637	-0.056	0.608	-0.001	0.991	0.059	0.591
p-Elk-1	-0.020	0.858	-0.067	0.538	0.091	0.404	-0.164	0.127
p-ATF-2	0.218	0.044	0.019	0.860	-0.070	0.521	-0.043	0.694
Ap-1	-0.046	0.672	0.216	0.046	0.015	0.892	-0.087	0.424
Bcl-2	0.024	0.825	0.212	0.050	-0.117	0.284	0.031	0.779
p53 mut	-0.051	0.642	-0.061	0.574	-0.021	0.850	0.102	0.352
Bax	-0.042	0.703	0.171	0.115	-0.100	0.359	0.038	0.729
PUMA	-0.070	0.522	-0.097	0.375	-0.071	0.517	-0.007	0.946
Bcl-xL	0.086	0.432	-0.049	0.654	0.040	0.713	-0.031	0.777
Nova	-0.143	0.190	0.011	0.922	-0.081	0.456	-0.080	0.466

	Invasión perineural		Implicación de ganglios		Márgenes quirúrgicos positivos		Progresión bioquímica		Supervivencia	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
IL-1a	-0.083	0.446	0.085	0.439	0.016	0.885	-0.242	0.025	-0.083	0.446
IL-1B	-0.058	0.595	-0.015	0.888	-0.156	0.151	-0.035	0.748	-0.058	0.595
IL-1RI	-0.136	0.213	0.089	0.415	-0.096	0.378	0.003	0.976	0.016	0.885
IL-1RII	-0.083	0.446	0.085	0.439	-0.056	0.610	-0.021	0.845	-0.005	0.965
IL-1Ra	0.045	0.683	0.174	0.109	0.082	0.454	0.259	0.016	0.153	0.161
MEK-6	0.066	0.549	0.024	0.827	0.086	0.433	0.077	0.479	-0.180	0.098
p38	-0.093	0.395	-0.226	0.036	-0.090	0.409	-0.287	0.007	-0.198	0.068
NF-kB p50	-0.294	0.006	-0.029	0.791	-0.269	0.012	-0.140	0.198	-0.294	0.006
NF-kB p65	0.053	0.627	0.003	0.979	0.079	0.470	0.080	0.464	-0.007	0.949
p-Elk-1	0.055	0.618	-0.095	0.384	-0.105	0.334	0.095	0.386	-0.117	0.283
p-ATF-2	-0.223	0.039	-0.105	0.337	0.114	0.298	0.083	0.447	-0.051	0.642
Ap-1	-0.012	0.911	0.066	0.548	0.060	0.583	-0.058	0.599	-0.108	0.321
Bcl-2	0.026	0.810	0.000	1.000	0.215	0.047	0.025	0.822	0.184	0.090
p53 mut	0.009	0.937	0.049	0.656	0.061	0.579	0.041	0.710	0.133	0.221
Bax	-0.071	0.518	0.179	0.099	0.005	0.962	-0.023	0.832	-0.125	0.205
PUMA	-0.083	0.446	-0.081	0.460	0.087	0.424	0.052	0.633	-0.083	0.446
Bcl-xL	0.055	0.618	0.025	0.818	-0.001	0.991	-0.066	0.546	-0.117	0.283
Nova	-0.171	0.114	0.042	0.701	0.150	0.168	-0.132	0.224	-0.028	0.796

Tabla 17. Correlación entre la expresión en el estroma de los componentes de la ruta IL-1/p38/NF-kB/ATF-2/AP-1/Elk-1 y las características clínico patológicas de cáncer de próstata (prueba de Spearman). Los valores en negrita resalta la significancia estadística (p<0.05).

1.4.2 Correlación entre la expresión de la inmunohistoquímica en el tumor y los marcadores clásicos.

La expresión en el tumor de IL-1RI, MEK-6, NF-kB p65, Bcl-2, mp53, Bax y PUMA no tuvo ninguna asociación significativa con los marcadores clásicos (Tabla 18). Se estableció una relación inversa entre la inmunotinción de IL-1a con la progresión bioquímica; entre NF-kB p50 con el estadio T patológico, la invasión perineural y supervivencia; entre p38 con la puntuación Gleason y la progresión bioquímica; entre p-Elk-1 con puntuación Gleason y supervivencia; entre Bcl-xL con la supervivencia; y entre p-ATF-2 con la

invasión perineural. IL-1B e IL-1RII se relacionan de manera directa con el estadio T clínico; Ap-1 con el estadio T patológico; el receptor antagonista IL-1Ra con la progresión bioquímica; y Nova con los márgenes quirúrgicos.

	PSA sérico preoperatorio		Estadio T patológico		Estadio T clínico		Puntuación Gleason	
	r	p	r	p	r	p	r	p
IL-1a	-0.046	0.672	-0.040	0.714	0.186	0.087	0.014	0.896
IL-1B	-0.050	0.651	-0.140	0.197	0.260	0.016	-0.051	0.643
IL-1RI	0.102	0.352	-0.036	0.745	0.172	0.112	-0.031	0.777
IL-1RII	0.075	0.492	-0.072	0.512	0.279	0.009	0.091	0.403
IL-1Ra	0.039	0.723	0.156	0.152	0.181	0.095	0.138	0.206
MEK-6	-0.081	0.456	0.079	0.471	0.099	0.365	0.050	0.648
p38	0.150	0.167	-0.012	0.913	0.035	0.751	-0.269	0.012
NF-kB p 50	0.081	0.461	-0.333	0.002	-0.135	0.216	-0.095	0.382
NF-kB p 65	-0.089	0.417	-0.028	0.796	0.124	0.255	-0.065	0.553
p-Elk-1	-0.008	0.943	0.046	0.675	0.100	0.358	-0.234	0.030
p-ATF-2	0.139	0.202	0.019	0.860	-0.146	0.179	0.057	0.602
Ap1	-0.046	0.672	0.216	0.046	0.015	0.892	-0.087	0.424
Bcl-2	0.055	0.615	0.010	0.928	-0.146	0.181	-0.204	0.059
p53 mut	0.010	0.929	0.077	0.512	0.050	0.644	0.147	0.176
Bax	0.117	0.282	0.200	0.065	-0.007	0.952	0.063	0.565
PUMA	-0.084	0.439	0.179	0.100	-0.045	0.680	0.019	0.864
Bcl-xL	0.081	0.461	-0.042	0.702	0.083	0.448	-0.095	0.382
Nova	-0.157	0.149	0.072	0.512	-0.030	0.784	-0.064	0.560

	Invasión perineural		Implicación de ganglios		Márgenes quirúrgicos positivos		Progresión bioquímica		Supervivencia	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
IL-1a	-0.204	0.059	0.066	0.548	-0.027	0.802	-0.237	0.028	-0.108	0.321
IL-1B	-0.185	0.088	-0.015	0.888	-0.156	0.151	-0.094	0.387	-0.058	0.595
IL-1RI	-0.001	0.994	-0.044	0.688	-0.015	0.888	0.004	0.973	0.070	0.522
IL-1RII	-0.083	0.446	0.085	0.439	-0.127	0.243	-0.021	0.845	0.074	0.498
IL-1Ra	0.068	0.532	0.133	0.221	0.099	0.366	0.320	0.003	0.128	0.241
MEK-6	0.066	0.549	0.024	0.827	0.086	0.433	0.077	0.479	-0.180	0.098
p38	-0.197	0.069	-0.082	0.452	-0.115	0.291	-0.239	0.027	-0.197	0.069
NF-kB p 50	-0.329	0.002	-0.003	0.978	-0.164	0.132	0.005	0.966	-0.207	0.056
NF-kB p 65	0.117	0.283	-0.158	0.147	0.171	0.116	0.004	0.969	-0.012	0.913
p-Elk-1	0.102	0.350	-0.029	0.791	0.031	0.774	-0.017	0.880	-0.294	0.006
p-ATF-2	-0.223	0.039	0.076	0.490	0.035	0.746	0.164	0.133	0.035	0.750
Ap1	-0.012	0.911	0.066	0.548	0.060	0.583	-0.058	0.599	-0.108	0.321
Bcl-2	-0.063	0.562	-0.166	0.126	0.033	0.766	-0.196	0.071	-0.009	0.931
p53 mut	0.103	0.345	0.071	0.518	0.088	0.420	0.144	0.187	0.194	0.074
Bax	-0.037	0.737	0.126	0.247	-0.065	0.554	0.075	0.495	0.016	0.884
PUMA	0.050	0.651	-0.078	0.475	0.076	0.489	0.139	0.201	-0.038	0.726
Bcl-xL	0.038	0.730	-0.003	0.978	-0.052	0.632	-0.110	0.314	-0.207	0.056
Nova	0.013	0.908	-0.119	0.274	0.253	0.019	-0.026	0.815	0.013	0.908

Tabla 18. Correlación entre la expresión en el tumor de los componentes de la ruta IL-1/p38/NF-kB/ATF-2/AP-1/Elk-1 y las características clínico patológicas de cáncer de próstata (prueba de Spearman). Los valores en negrita resalta la significancia estadística (p<0.05).

1.4.3 Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el estroma y los marcadores clásicos.

Para IL-1a, IL-B y sus receptores, MEK-6, NF-kB p65, p-Elk-1, Ap-1, PUMA, Bcl-xL y Nova no se encontró ninguna asociación significativa entre la intensidad de estas proteínas con los marcadores clásicos (Tabla 19). La correlación de la intensidad en el estroma fue negativa entre p38 con la implicación de ganglios y la progresión bioquímica; entre NF-kB p50 con el estadio T patológico, márgenes quirúrgicos y supervivencia; y entre p-ATF-2 y mp53 con el estadio T clínico. Bcl-2 presenta una relación positiva con el estadio T patológico y la supervivencia; y Bax con la implicación de ganglios.

	PSA sérico preoperatorio		Estadio T patológico		Estadio T clínico		Puntuación Gleason	
	r	p	r	p	r	p	r	p
IL-1a	0.054	0.621	-0.073	0.505	0.054	0.620	0.075	0.495
IL-1B	0.050	0.650	-0.119	0.277	0.171	0.115	0.004	0.969
IL-1RI	0.142	0.192	-0.087	0.423	0.145	0.182	-0.087	0.426
IL-1RII	0.132	0.224	-0.046	0.675	0.131	0.228	0.074	0.499
IL-1Ra	0.053	0.625	0.000	0.998	0.091	0.407	0.065	0.552
MEK-6	-0.169	0.120	-0.099	0.367	-0.127	0.245	0.026	0.814
p38	0.050	0.650	0.018	0.869	-0.017	0.876	-0.174	0.108
NF-kB p50	0.134	0.218	-0.239	0.026	0.001	0.992	-0.121	0.267
NF-kB p65	-0.116	0.289	-0.073	0.503	0.085	0.435	0.073	0.503
p-Elk-1	0.019	0.859	0.022	0.839	0.088	0.423	-0.139	0.200
p-ATF-2	0.056	0.606	-0.006	0.959	-0.316	0.003	0.031	0.776
Ap-1	-0.145	0.184	0.189	0.082	0.118	0.277	0.104	0.342
Bcl-2	0.036	0.740	0.212	0.050	-0.184	0.090	0.059	0.592
p53 mut	0.082	0.452	-0.092	0.399	-0.231	0.032	-0.183	0.092
Bax	0.003	0.975	0.203	0.060	-0.089	0.414	0.043	0.695
PUMA	0.004	0.972	0.011	0.307	0.064	0.557	-0.066	0.543
Bcl-xL	0.104	0.340	0.111	0.308	0.028	0.797	-0.026	0.810
Nova	-0.095	0.385	-0.107	0.326	-0.126	0.249	-0.160	0.141

	Invasión perineural		Implicación de ganglios		Márgenes quirúrgicos positivos		Progresión bioquímica		Supervivencia	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
IL-1a	-0.036	0.743	0.184	0.090	-0.014	0.899	-0.147	0.176	-0.036	0.743
IL-1B	-0.096	0.378	-0.041	0.710	-0.160	0.141	-0.146	0.181	-0.096	0.378
IL-1RI	-0.089	0.414	0.170	0.118	-0.081	0.460	0.006	0.954	-0.049	0.655
IL-1RII	-0.036	0.743	0.013	0.903	-0.008	0.944	0.000	1.00	-0.074	0.499
IL-1Ra	0.016	0.881	0.105	0.335	0.020	0.855	0.165	0.129	0.056	0.607
MEK-6	0.009	0.936	-0.014	0.899	-0.035	0.746	0.028	0.796	0.057	0.600
p38	-0.089	0.418	-0.221	0.041	-0.049	0.654	-0.277	0.010	-0.187	0.085
NF-kB p50	-0.180	0.098	0.024	0.827	-0.308	0.004	-0.171	0.116	-0.311	0.004
NF-kB p65	0.094	0.389	0.072	0.510	0.124	0.256	0.165	0.129	0.033	0.762
p-Elk-1	-0.021	0.847	-0.118	0.278	-0.026	0.815	0.079	0.470	-0.007	0.949
p-ATF-2	-0.178	0.102	-0.142	0.191	0.112	0.303	-0.014	0.899	-0.086	0.434
Ap-1	-0.030	0.787	0.025	0.820	0.105	0.335	0.028	0.800	-0.038	0.745
Bcl-2	0.063	0.564	-0.039	0.722	0.163	0.135	0.010	0.929	0.209	0.053
p53 mut	0.010	0.930	-0.104	0.342	0.152	0.162	-0.060	0.581	-0.087	0.426
Bax	-0.050	0.644	0.221	0.040	0.032	0.772	0.015	0.890	-0.118	0.280
PUMA	0.008	0.940	-0.070	0.520	0.056	0.608	0.017	0.876	-0.168	0.122
Bcl-xL	-0.015	0.893	0.078	0.473	0.024	0.829	-0.075	0.492	-0.154	0.158
Nova	-0.106	0.332	0.112	0.303	0.004	0.968	-0.187	0.084	-0.080	0.464

Tabla 19. Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el estroma de los componentes de la ruta IL-1/p38/NF-kB/ATF-2/AP-1/Elk-1 y las características clínico patológicas de cáncer de próstata (prueba de Spearman). Los valores en negrita resalta la significancia estadística (p<0.05).

1.4.4 Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el tumor y los marcadores clásicos.

Para la intensidad de la inmunohistoquímica en el tumor de MEK-6, NF-kB p65, p-ATF-2, Ap-1, mp53, Bax, PUMA y Nova no se encontró ninguna asociación significativa con los marcadores clásicos (Tabla 20). La intensidad de la inmunotinción en el tumor presentó una relación significativamente inversa entre IL-1a con la invasión perineural, progresión bioquímica y la supervivencia; entre NF-kB p50 con el estadio T patológico e invasión perineural; entre p38 y p-Elk-1 con la puntuación Gleason; entre Bcl-2 con estadio T clínico; y entre Bcl-xL con la supervivencia. La relación fue directa entre IL-1B, IL-1RI e IL-1RII con el estadio T clínico; entre IL-1RII con el PSA sérico preoperatorio; y entre IL-1Ra con la progresión bioquímica.

	PSA sérico preoperatorio		Estadio T patológico		Estadio T clínico		Puntuación Gleason	
	r	p	r	p	r	p	r	p
IL-1a	0.038	0.728	-0.006	0.957	0.171	0.115	0.091	0.403
IL-1B	0.012	0.912	-0.076	0.489	0.257	0.017	-0.038	0.732
IL-1RI	0.058	0.595	-0.062	0.571	0.234	0.030	-0.037	0.737
IL-1RII	0.211	0.051	0.012	0.916	0.246	0.022	-0.014	0.898
IL-1Ra	0.047	0.667	0.050	0.168	0.125	0.250	0.045	0.679
MEK-6	-0.166	0.127	0.051	0.643	0.092	0.402	-0.042	0.699
p38	0.123	0.260	-0.011	0.923	0.002	0.989	-0.261	0.015
NF-kB p50	0.084	0.440	-0.274	0.011	-0.038	0.729	-0.017	0.878
NF-kB p65	-0.131	0.229	-0.029	0.791	0.175	0.106	-0.094	0.389
p-ELK-1	-0.024	0.828	-0.029	0.789	0.790	0.467	-0.210	0.052
p-ATF-2	0.025	0.821	0.009	0.932	-0.176	0.106	0.178	0.101
Ap-1	-0.102	0.351	0.124	0.256	0.041	0.708	0.022	0.839
Bcl-2	0.081	0.460	0.044	0.686	-0.219	0.042	-0.162	0.136
p53 mut	0.136	0.212	0.020	0.858	-0.137	0.209	-0.094	0.388
Bax	0.119	0.275	0.191	0.079	0.008	0.938	0.095	0.386
PUMA	-0.084	0.439	0.179	0.100	-0.045	0.680	0.019	0.864
Bcl-xl	0.171	0.115	0.103	0.344	0.009	0.934	-0.036	0.740
Nova	-0.075	0.494	-0.030	0.787	-0.008	0.940	-0.196	0.071

	Invasión perineural		Implicación de ganglios		Márgenes quirúrgicos positivos		Progresión bioquímica		Supervivencia	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
IL-1a	-0.216	0.045	0.089	0.417	0.035	0.748	-0.218	0.044	-0.206	0.057
IL-1B	-0.140	0.199	0.015	0.890	-0.123	0.259	-0.035	0.749	-0.062	0.572
IL-1RI	-0.089	0.418	0.050	0.648	0.003	0.980	0.099	0.364	-0.109	0.319
IL-1RII	-0.132	0.224	0.101	0.354	-0.142	0.191	0.056	0.606	0.012	0.912
IL-1Ra	-0.032	0.772	0.115	0.292	0.071	0.518	0.233	0.031	0.065	0.551
MEK-6	0.133	0.221	0.049	0.656	0.062	0.570	-0.073	0.502	-0.119	0.275
p38	-0.145	0.184	-0.039	0.722	-0.046	0.672	-0.177	0.103	-0.145	0.184
NF-kB p50	-0.227	0.036	0.077	0.478	-0.083	0.445	0.125	0.253	-0.140	0.199
NF-kB p65	0.102	0.351	-0.143	0.190	0.139	0.202	-0.046	0.676	-0.011	0.923
p-Elk-1	-0.058	0.593	0.040	0.716	0.011	0.920	0.148	0.174	-0.057	0.604
p-ATF-2	-0.171	0.117	0.047	0.666	0.086	0.432	0.055	0.617	-0.067	0.538
Ap-1	-0.045	0.678	0.117	0.284	0.073	0.507	-0.045	0.679	-0.073	0.503
Bcl-2	-0.151	0.164	-0.175	0.108	0.021	0.851	-0.191	0.077	0.005	0.963
p53 mut	0.045	0.681	-0.059	0.587	0.097	0.375	0.049	0.652	-0.087	0.424
Bax	0.000	1.000	0.146	0.181	-0.039	0.721	0.056	0.609	-0.017	0.879
PUMA	0.050	0.651	-0.078	0.475	0.076	0.489	0.139	0.201	-0.038	0.726
Bcl-xl	0.025	0.820	0.112	0.306	-0.115	0.293	-0.161	0.138	-0.278	0.009
Nova	-0.149	0.170	0.027	0.804	0.042	0.701	-0.135	0.216	-0.006	0.960

Tabla 20. Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el tumor de los componentes de la ruta IL-1/p38/NF-kB/ATF-2/AP-1/Elk-1 y las características clínico patológicas de cáncer de próstata (prueba de Spearman). Los valores en negrita resalta la significancia estadística (p<0.05).

1.5 Correlación de la expresión de la vía de transducción IL-1/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 y tiempo de recurrencia bioquímica (análisis de supervivencia)

El análisis de supervivencia Kaplan-Meier y el test del *log-rank* de los miembros de la ruta estudiados (Figura 24), mostro que los pacientes positivos para la expresión en el estroma y en el tumor de la IL-1a y p38 tuvieron tiempos de progresión bioquímica más largos que los negativos. Para los positivos de IL-1Ra los tiempos de progresión bioquímica fueron más cortos que los negativos.

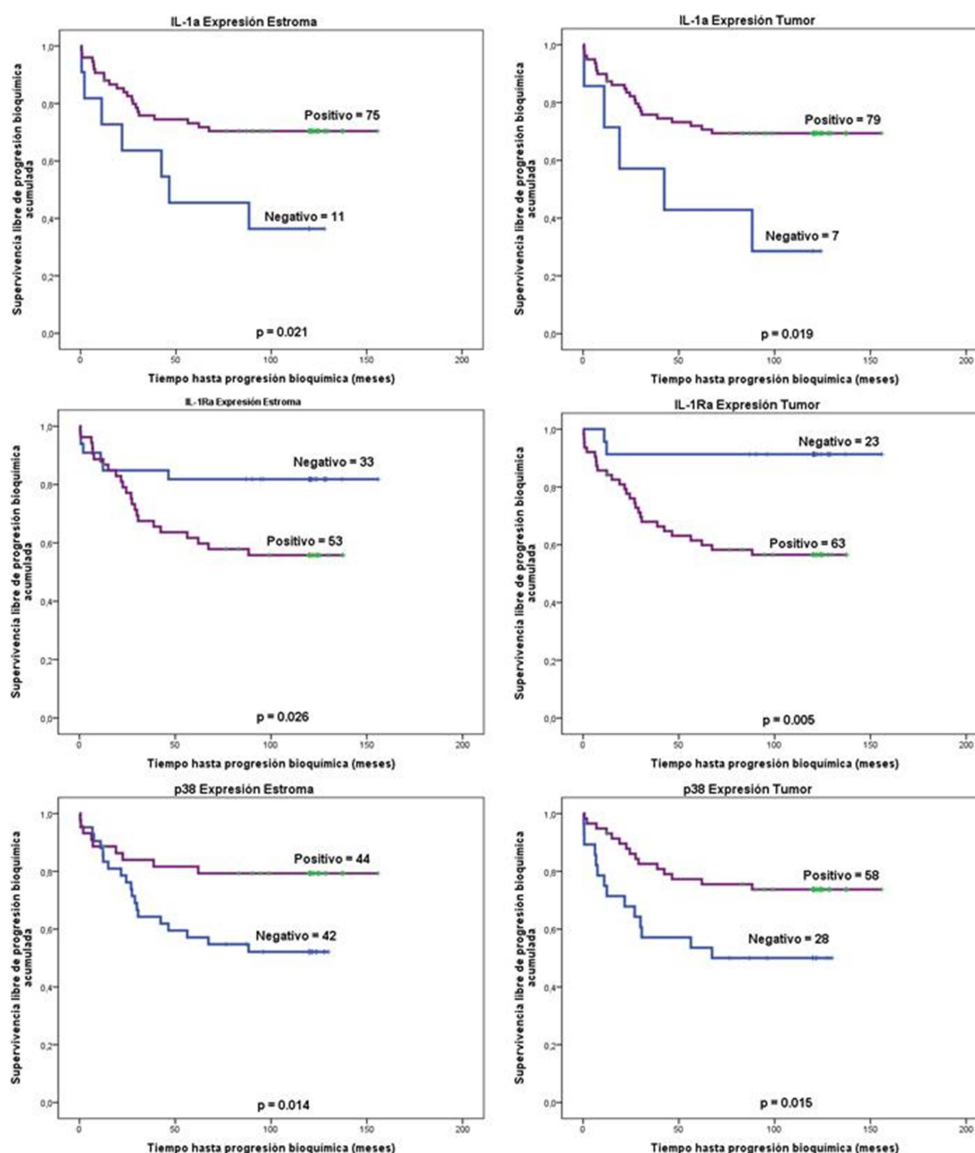


Figura 25. Análisis de Kaplan-Meier de la expresión de los componentes de la vía de transducción IL-1/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 con resultados significativos. Las barras verticales se corresponden con observaciones censuradas. El valor de p corresponde a la prueba del *log-rank*.

En el análisis de supervivencia Kaplan-Meier y la prueba de *log-rank* para la intensidad de los componentes de la ruta (Figura 25), los pacientes positivos altos en el estroma para p38 presentaron tiempos de progresión bioquímica medianamente más cortos que los positivos bajos. La intensidad de IL-1Ra en el estroma y en el tumor demuestra que los pacientes positivos bajos tienen tiempos de supervivencia más cortos que los positivos altos. La intensidad de IL-1a en el tumor demuestra que los pacientes positivos bajos tuvieron tiempos de progresión bioquímica más cortos que los positivos altos.

El modelo de la regresión de riesgos proporcionales de Cox unifactorial (Tabla 21) confirmaron los resultados obtenidos para IL-1a, IL-1Ra y p38 en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para la expresión en el estroma y el tumor.

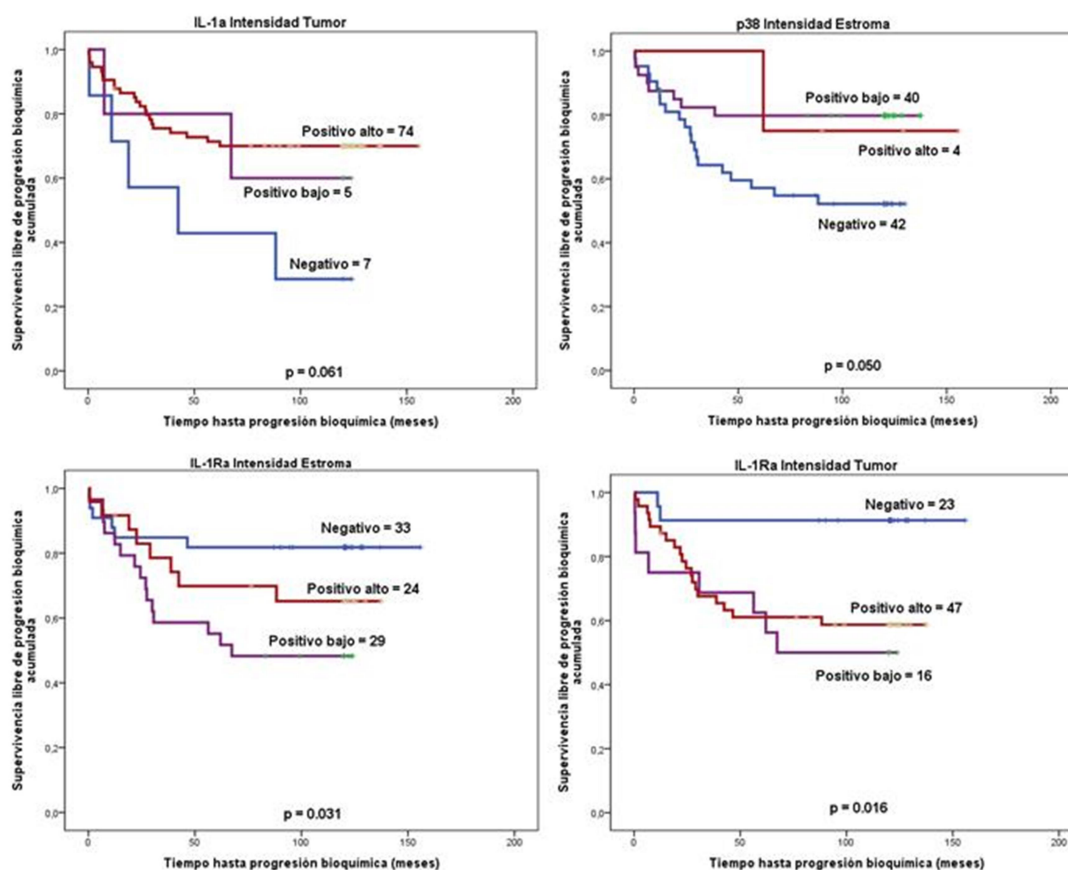


Figura 25. Análisis de Kaplan-Meier de la intensidad de la inmunotinción de los componentes de la vía IL-1/p38/NF- κ B/ATF/AP-1/Elk-1 con resultados significativos. Las barras verticales se corresponden con observaciones censuradas. El valor de p corresponde a la prueba del *log-rank*.

Estroma	p	RR (IC 95%)	Tumor	p	RR (IC 95%)
IL-1a	0.024	0.380 (0.162-0.891)	IL-1a	0.026	0.334 (0.127 -0.877)
IL-1B	0.973	0.985 (0.421-2.307)	IL-1B	0.551	0.781 (0.346-1.763)
IL-1RI	0.810	0.879 (0.305-2.529)	IL-1RI	0.873	0.924 (0.352-2.424)
IL-1RII	0.960	0.973 (0.339-2.797)	IL-1RII	0.959	1.028 (0.358-2.954)
IL-1Ra	0.033	2.668 (1.085-6.562)	IL-1Ra	0.014	6.025 (1.431-25.35)
MEK-6	0.666	20.53(0.0-18713849)	MEK-6	0.666	20.53 (0.0-18713849)
p38	0.018	0.388 (0.176-0.852)	p38	0.018	0.415 (0.200-0.861)
NF-kB p50	0.150	0.549 (0.243-1.241)	NF-kB p50	0.810	0.901 (0.385-2.109)
NF-kB p65	0.582	1.287 (0.524-3.162)	NF-kB p65	0.945	0.969 (0.395-2.380)
p-Elk-1	0.464	1.374 (0.587-3.218)	p-Elk-1	0.735	0.856 (0.349-2.104)
p-ATF-2	0.408	1.833 (0.436-7.713)	p-ATF-2	0.932	1.023 (0.604-1.732)
Ap-1	0.621	0.739 (0.223-2.446)	Ap-1	0.621	0.739 (0.223-2.446)
Bcl-2	0.729	1.137 (0.549-2.357)	Bcl-2	0.082	0.524 (0.252-1.086)
mp53	0.706	1.469 (0.200-10.79)	mp53	0.235	3.352 (0.456-24.64)
Bax	0.856	0.931 (0.433-2.003)	Bax	0.517	1.272 (0.614-2.636)
PUMA	0.745	1.220 (0.369-4.031)	PUMA	0.680	1.353 (0.322-5.691)
Bcl-xL	0.429	0.734 (0.341-1.579)	Bcl-xL	0.242	0.625 (0.284-1.374)
Nova	0.244	0.425 (0.101-1.790)	Nova	0.769	0.836 (0.253-2.764)

Tabla 21: Análisis de Cox unifactorial de la expresión en estroma y tumor de los marcadores en estudio de la vía de transducción IL-1/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 para el tiempo de recurrencia bioquímica. RR: razón de riesgo; IC: intervalo de confianza.

Sin embargo, los resultados del modelo de la regresión de riesgos proporcionales de Cox unifactorial (Tabla 22), solo confirmaron los resultados para la intensidad IL-1a en el tumor y p38 en el estroma, no así para IL-1Ra.

Estroma	p	RR (IC 95%)	Tumor	p	RR (IC 95%)
IL-1a	0.137	0.653 (0.372-1.146)	IL-1a	0.030	0.585 (0.361-0.949)
IL-1B	0.436	0.848 (0.561-1.283)	IL-1B	0.822	0.952 (0.623-1.457)
IL-1RI	0.803	0.938 (0.556-1.553)	IL-1RI	0.492	1.198 (0.716-2.006)
IL-1RII	0.958	1.014 (0.606-1.697)	IL-1RII	0.634	1.145 (0.655-2.003)
IL-1Ra	0.197	1.337 (0.860-2.077)	IL-1Ra	0.073	1.366 (0.970-2.018)
MEK-6	0.685	1.191 (0.511-2.776)	MEK-6	0.940	0.956 (0.294-3.109)
p38	0.028	0.447 (0.218-0.916)	p38	0.101	0.620 (0.351-1.097)
NF-kB p50	0.082	0.693 (0.459-1.048)	NF-kB p50	0.491	1.181 (0.736-1.895)
NF-kB p65	0.204	1.364 (0.845-2.201)	NF-kB p65	0.654	0.904 (0.583-1.402)
p-Elk-1	0.520	1.196 (0.693-2.064)	p-Elk-1	0.334	1.301 (0.763-2.219)
p-ATF-2	0.932	1.023 (0.604-1.732)	p-ATF-2	0.387	1.293 (0.722-2.315)
Ap-1	0.906	1.037 (0.568-1.895)	Ap-1	0.601	0.856 (0.479-1.531)
Bcl-2	0.931	1.021 (0.640-1.628)	Bcl-2	0.090	0.651 (0.396-1.069)
mp53	0.688	0.882 (0.476-1.633)	mp53	0.498	1.226 (0.679-2.214)
Bax	0.575	1.164 (0.685-1.977)	Bax	0.607	1.105 (0.756-1.614)
PUMA	0.669	0.830 (0.369-4.031)	PUMA	0.905	1.035 (0.590-1.815)
Bcl-xL	0.419	0.818 (0.503-1.331)	Bcl-xL	0.112	0.688 (0.433-1.091)
Nova	0.079	0.575 (0.310-1.066)	Nova	0.235	0.737 (0.444-1.220)

Tabla 22: Análisis de Cox unifactorial de la intensidad en estroma y tumor de los marcadores de la vía de transducción IL-1/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 en estudio para el tiempo de recurrencia bioquímica. RR: razón de riesgo; IC: intervalo de confianza.

2. Estudio comparativo de la expresión de la vía de EGF/IL-6/MEK/ERK en el estroma y tumor en próstata normal y patológica

2.1 Análisis por *Western Blot* de la vía de EGF/IL-6/MEK/ERK en próstata normal, HBP y cáncer de próstata

Mediante Western Blot se comprobó que la especificidad de todos los anticuerpos se correspondía con el peso molecular descrito por la casa comercial.

2.2 Análisis de la expresión de la vía EGF/IL-6/MEK/ERK en próstata normal, HBP y cáncer de próstata

2.2.1 Activación EGF y su receptor

EGF:

En PN (Figura 26A), biopsias y próstatas patológicas no hubo expresión en el estroma para EGF. En PN y HBP se detectó en las células basales. En cáncer se observó en el citoplasma de las células epiteliales. El porcentaje de muestras positivas con expresión en el epitelio disminuye con la patología (Tabla 23). Entre HBP (Figura 26B), PIN y cáncer (Figura 26C) en el epitelio no se obtuvieron diferencias significativas de las densidades ópticas siendo menor en PN. De las muestras positivas para EGF, 63.4% de los pacientes presentaron valores de PSA >10 ng/ml.

EGFR:

En PN el 100% de las muestras fueron positivas para EGFR (Tabla 23). En cáncer, PIN e HBP el porcentaje de muestras positivas disminuye. En PN (Figura 26D) la inmunotinción se detectó en las células basales. En BPH (Figura 26E) destaca en la zona perinuclear y en cáncer (Figura 26F) la inmunotinción fue intensa en el citoplasma de las células epiteliales. Entre PN y las muestras con patologías prostáticas las densidades ópticas no presentaron diferencias significativas en el estroma, sin embargo, se incrementa en el epitelio glandular en todos los grupos patológicos sin existir significación entre los distintos grupos. De las muestras positivas para EGFR, 82.1% de los pacientes presentaron puntuación Gleason <7.

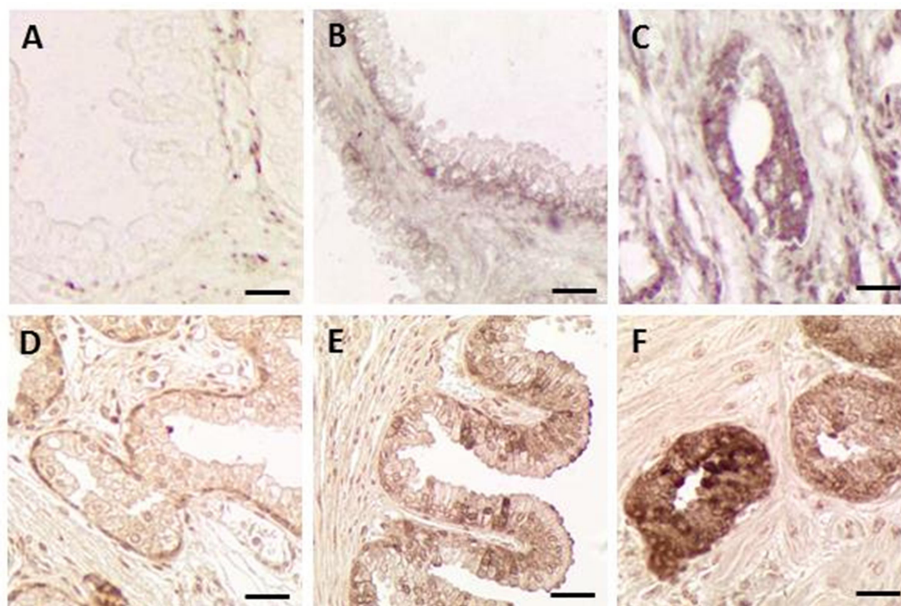


Figura 26. Expresión de EGF (A-C) y EGFR (D-F) próstata normal (A, D), HBP (B, E) y cáncer (C, F). Barra: 20 μ m (A, C), 25 μ m (B, D, F) y 30 μ m (E).

	EGF			EGFR		
	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.
PN	100 (20)	6.8 \pm 2.2 ^a	-----	100 (20)	13.5 \pm 2.9 ^a	4.18 \pm 1.1
HBP	80.0 (28)	21.8 \pm 2.58 ^b	2.66 \pm 1.4	57.1 (20)	25.4 \pm 2.01 ^b	3.99 \pm 2.5
PIN	83.3 (12)	21.4 \pm 2.37 ^b	3.55 \pm 2.4	86.7 (13)	26.5 \pm 2.45 ^b	3.95 \pm 2.5
Cáncer	47.7 (41)	21.25 \pm 2.75 ^b	3.67 \pm 2.2	97.7 (84)	27.45 \pm 2.98 ^b	3.98 \pm 2.5

Tabla 23. Porcentaje de muestras positivas y densidad óptica de EGF y EGFR en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media \pm desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

2.2.2 Activación IL-6 y gp-130

IL-6:

En PN (Figura 27A) la inmunotinción fue intensa en el estroma. En HBP (Figura 27B) se localizó en las células basales y en cáncer de próstata (Figura 27C) destacó en la región perinuclear de las células epiteliales. En todos los casos, fue muy escasa en el estroma. El porcentaje de muestras positivas para IL-6 disminuyó con la malignidad (Tabla 24). Los valores de densidad óptica fueron similares en el estroma para todos cortes histológicos. En el epitelio, la menor D.O. apareció en PN y no hubo diferencias significativas entre el resto de los grupos (HBP, PIN y cáncer). De las muestras positivas para IL-6, el 77.3% no presentaron invasión perineural.

gp-130:

En PN (Figura 27D), HBP (Figura 27E) y cáncer (Figura 27F) la inmunotinción fue intensa en las células epiteliales. En todos los casos también se detectó en algunos núcleos. gp-130 se expresó en el 100% de las muestras normales (Tabla 24) aunque fue el grupo con menor densidad óptica. No se observaron diferencias significativas entre el resto de grupos estudiados. El 62.3% de las muestras positivas para gp-130 no presentaron márgenes quirúrgicos.

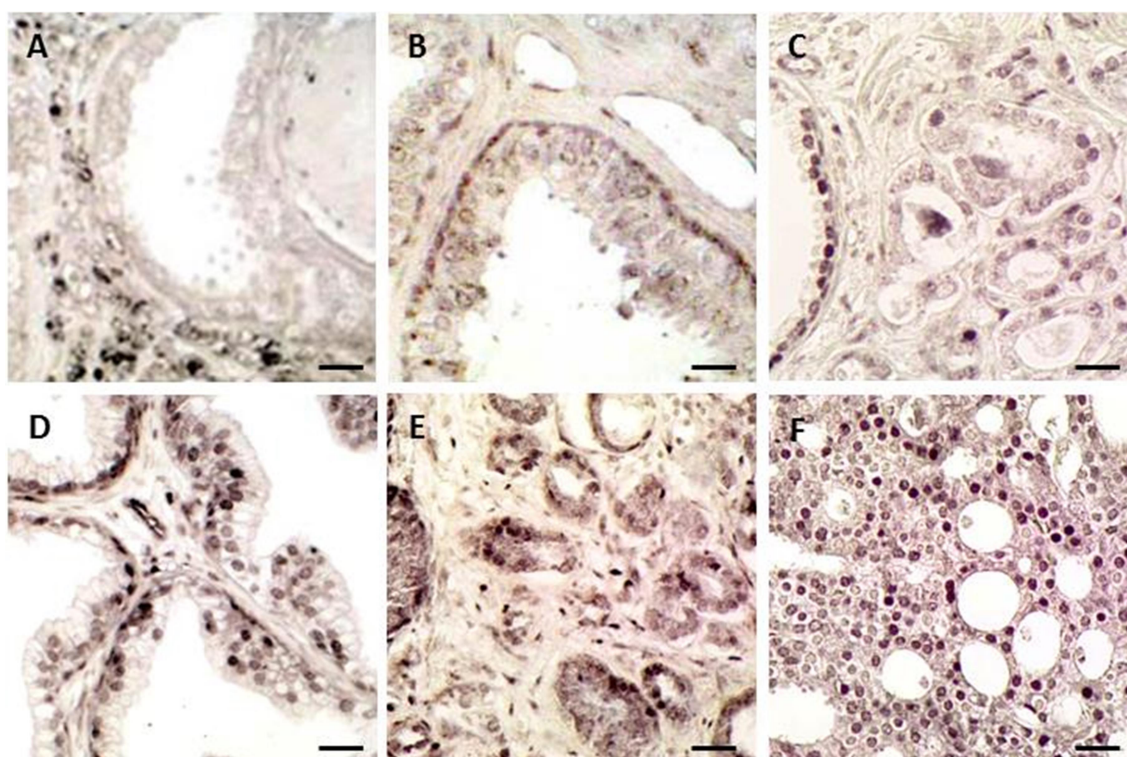


Figura 27. Expresión de IL-6 (A-C) y gp-130 (D-F) en próstata normal (A, D), HBP (B, E) y cáncer (C, F). Barra: 20 μ m (B, C, D, F), 25 μ m (A) y 30 μ m (E).

	IL-6			gp-130		
	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.
PN	100 (20)	6.80 \pm 2.21 ^a	5.6 \pm 2.4 ^a	100 (20)	13.5 \pm 2.9 ^a	-----
HBP	80.0 (28)	21.80 \pm 2.58 ^b	4.9 \pm 1.75 ^a	57.1 (20)	25.4 \pm 2.01 ^b	17.4 \pm 4.43 ^a
PIN	86.6 (13)	21.42 \pm 3.4 ^b	5.0 \pm 6.3	80 (12)	26.5 \pm 2.45 ^b	20.9 \pm 5.3
Cáncer	51.2 (44)	21.25 \pm 2.75 ^b	6.9 \pm 3.27 ^a	89.5 (77)	27.45 \pm 2.98 ^b	23.78 \pm 5.12 ^a

Tabla 24. Porcentaje de muestras positivas y densidades ópticas de IL-6 y gp-130 en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. Densidades ópticas (media \pm desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

2.2.3 Activación Raf-1/Rb

Raf-1:

Las próstatas normales (Figura 28A) no tuvieron expresión para Raf-1. En PIN (Figura 28B) y cáncer (Figura 28C) la inmunotinción fue intensa en el citoplasma de las células epiteliales, aunque débil en el estroma. En PIN y cáncer el porcentaje de muestras positivas y la densidad óptica aumenta con la patología siendo mayor en el epitelio (Tabla 25). De las muestras positivas para Raf-1, el 37.0% de los pacientes tuvieron progresión bioquímica.

Rb:

El 50% de las muestras de PN fueron positivas para Rb (Tabla 25), observándose el marcaje en los núcleos de las células epiteliales. En HBP se obtuvo el menor porcentaje de muestras positivas y la inmunotinción se observó en el núcleo de la mayoría de las células epiteliales y algunas estromáticas. Similar localización se observó en cáncer. La mayor densidad óptica se observó en cáncer. El 41.0% de las muestras positivas para Rb los pacientes tenían PSA<10 ng/ml.

pRb:

En PN el 75% de las muestras fueron positivas para pRB (Tabla 25) y el marcaje se observó en el núcleo de las células epiteliales. Similar señal se observó en PIN (Figura 28D), HBP (Figura 28E) y cáncer (Figura 28F) donde el 93%, 71.4% y 93% (respectivamente) de las muestras fueron positivas. Las densidades ópticas fueron mayores en el epitelio que en el estroma en todos los grupos, sin embargo, los valores más altos se obtienen en cáncer. De las muestras positivas para pRb, 17.6% de los pacientes tenían un Gleason ≥ 7 .

	Raf-1			Rb		
	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.
PN	----	----	----	50.0 (10)	4.66±1.36 ^a	----
HBP	37.1 (13)	19.93±2.55 ^a	20.99±2.8	35.7 (12)	64.37±8.19 ^c	4.17±1.50 [#]
PIN	46.6 (7)	31.18±1.39 ^b	15.40±1.4	66.6 (10)	35.23±5.28 ^b	11.02±3.31 [*]
Cáncer	53.5 (46)	34.15±2.87 ^c	17.39±3.7	45.3 (39)	80.15±12.32 ^d	28.30±1.81 [§]
	pRb					
	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.			
PN	----	----	1.35±0.91 [#]			
HBP	71.4 (25)	8.17±1.50 ^a	15.78±9.65 [¶]			
PIN	93.3 (14)	11.02±3.31 ^a	17.5±2.31 [¶]			
Cáncer	93.0 (80)	28.30±1.81 ^b	21.24±11.67 [§]			

Tabla 25. Porcentaje de muestras positivas y densidades ópticas de Raf-1, Rb y pRb en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media ± desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

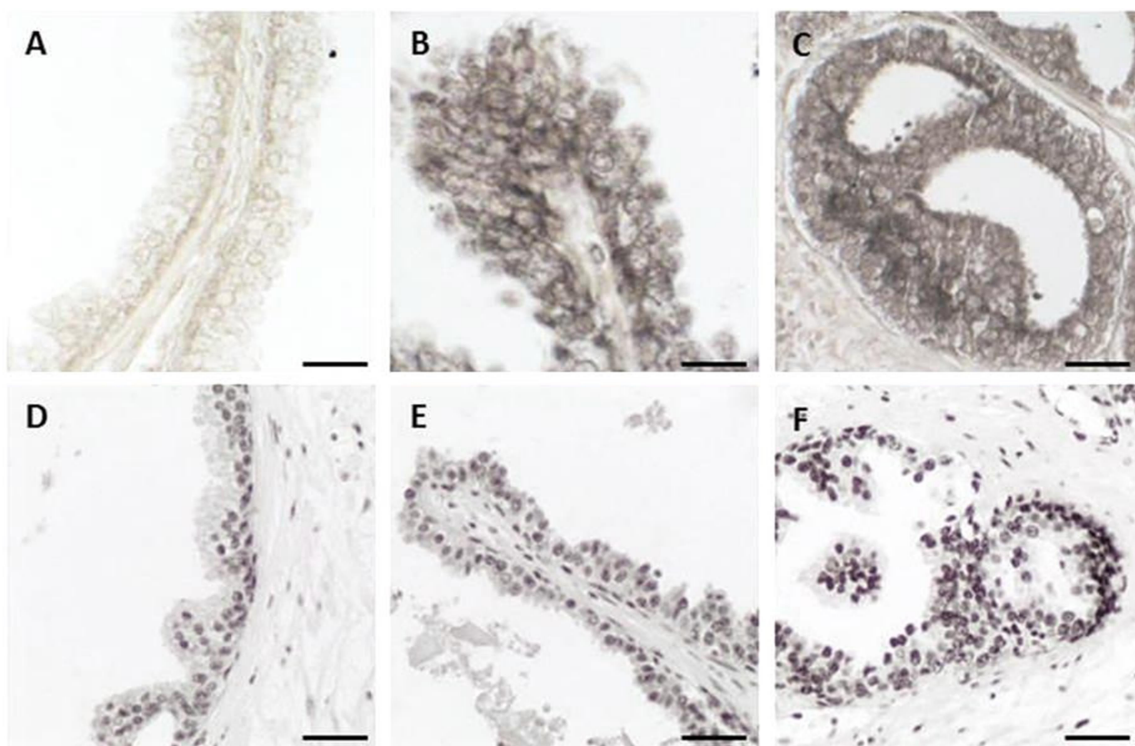


Figura 28. Expresión de Raf-1 (A-C) y pRb (D-F), en próstata normal (A), en BPH (E), PIN (B, D) y cáncer (C, F). Barra: 20 μ m (A-F).

2.2.4 Activación MEK-1/ERK

MEK-1:

En todas las muestras PN (biopsias) la señal para MEK-1 fue prácticamente indetectable (Tabla 26). El inmunomarcaje se observó en las células epiteliales de BPH (Figura 29A), PIN (Figura 29B) y cáncer (Figura 29C). La densidad óptica aumento con la patología en las células del epitelio glandular, en el estroma no hay diferencias significativas entre las patologías. En HBP la densidad más alta se obtienen en el estroma (Tabla 26). De las muestras positivas para MEK-1, el 25.5% presentó invasión perineural.

p-MEK:

En PN (Figura 29D) y HBP, la inmunoreactividad se encontró en las células basales mientras que en las células secretoras fue débil aunque aparecían algunos núcleos muy marcados. En PIN (Figura 29E) y cáncer (Figura 29F) se observó una intensa señal en los núcleos. La densidad óptica aumento significativamente en todas las patologías, siendo en el epitelio la más alta en HBP (Tabla 26). No hubo diferencias significativas en la D.O. del estroma entre los grupos con patología. El 40.0% de las muestras positivas para p-MEK presentaron márgenes quirúrgicos positivos.

	MEK-1			p-MEK		
	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.
PN	-----	-----	-----	40.0 (8)	29.77±1.8 ^a	-----
HBP	62.9 (22)	17.46±1.64 ^a	29.79±3.4	68.5 (24)	41.22±3.8 ^c	8.13±1.8 [*]
PIN	73.3 (11)	24.79±1.74 ^b	30.31±1.8	73.3 (11)	35.58±0.93 ^b	9.42±3.9 [‡]
Cáncer	59.3 (51)	31.68±2.53 ^c	29.59±5.2	32.6 (28)	35.28±2.65 ^b	10.32±2.4 [‡]

Tabla 26. Porcentaje de muestras positivas y densidades ópticas de MEK-1 y p-MEK en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media ± desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

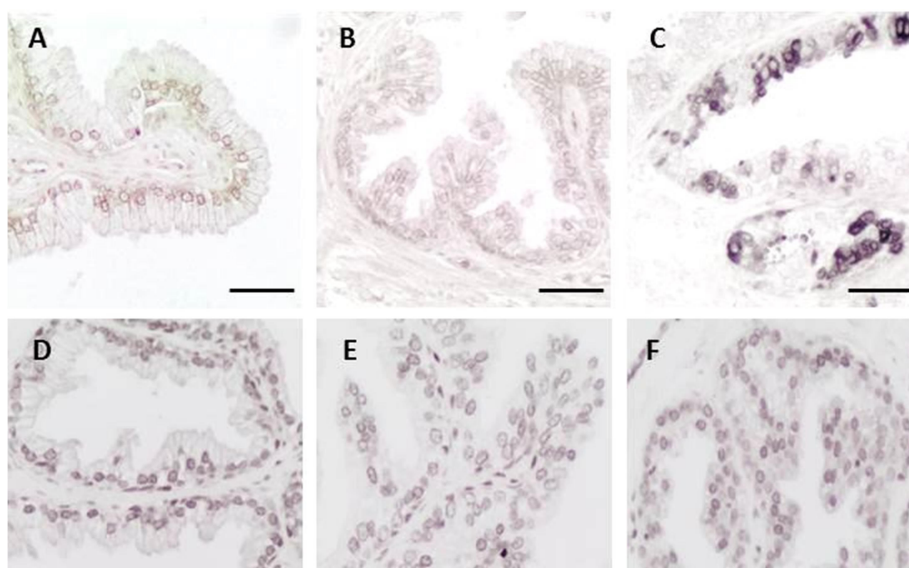


Figura 29. Expresión de MEK-1 (A-C) y p-MEK (D-F) próstata normal (D), HBP (A), PIN (B, E) y cáncer (C, F). Barra: 20 μm.

ERK-1:

ERK-1 se expresó en todas las muestras (Tabla 27). El inmunomarcaje apareció en el citoplasma de las células epiteliales, siendo muy intenso en cáncer. En PN (Figura 30A) y HBP el porcentaje de muestras positivas fue del 80% y se incrementó en PIN y cáncer (Figura 30B). La densidad óptica aumenta con la patología en el epitelio y estroma en todos los grupos (Tabla 27). De las muestras positivas para ERK-1, 65.9% de los pacientes no presentaron progresión bioquímica.

ERK-2:

El 100% de las próstatas normales fueron positivas para ERK-2. El porcentaje de muestras positivas disminuye con la patología, sin embargo, la densidad óptica aumenta en el epitelio mientras que en el estroma no se observaron diferencias significativas (Tabla 27). En PN (Figura 30C) la inmunotinción marca muy bien los núcleos y es débil en el citoplasma de las células del epitelio glandular. En cáncer (Figura 30D) marca la zona perinuclear. El 59.3% de las muestras positivas para ERK-2, los pacientes tenían PSA >10 ng/ml.

p-ERK:

En PN (Figura 30F) y HBP la inmunoreactividad para p-ERK fue débil mientras que en cáncer el marcaje fue más intenso en el citoplasma de las células epiteliales (Figura 30G). En PN y PIN el porcentaje de pacientes positivos fue del 40% (Tabla 27). En PIN y cáncer la densidad óptica aumenta en el epitelio, sin embargo, en el estroma no se observan diferencias significativas (Tabla 27).

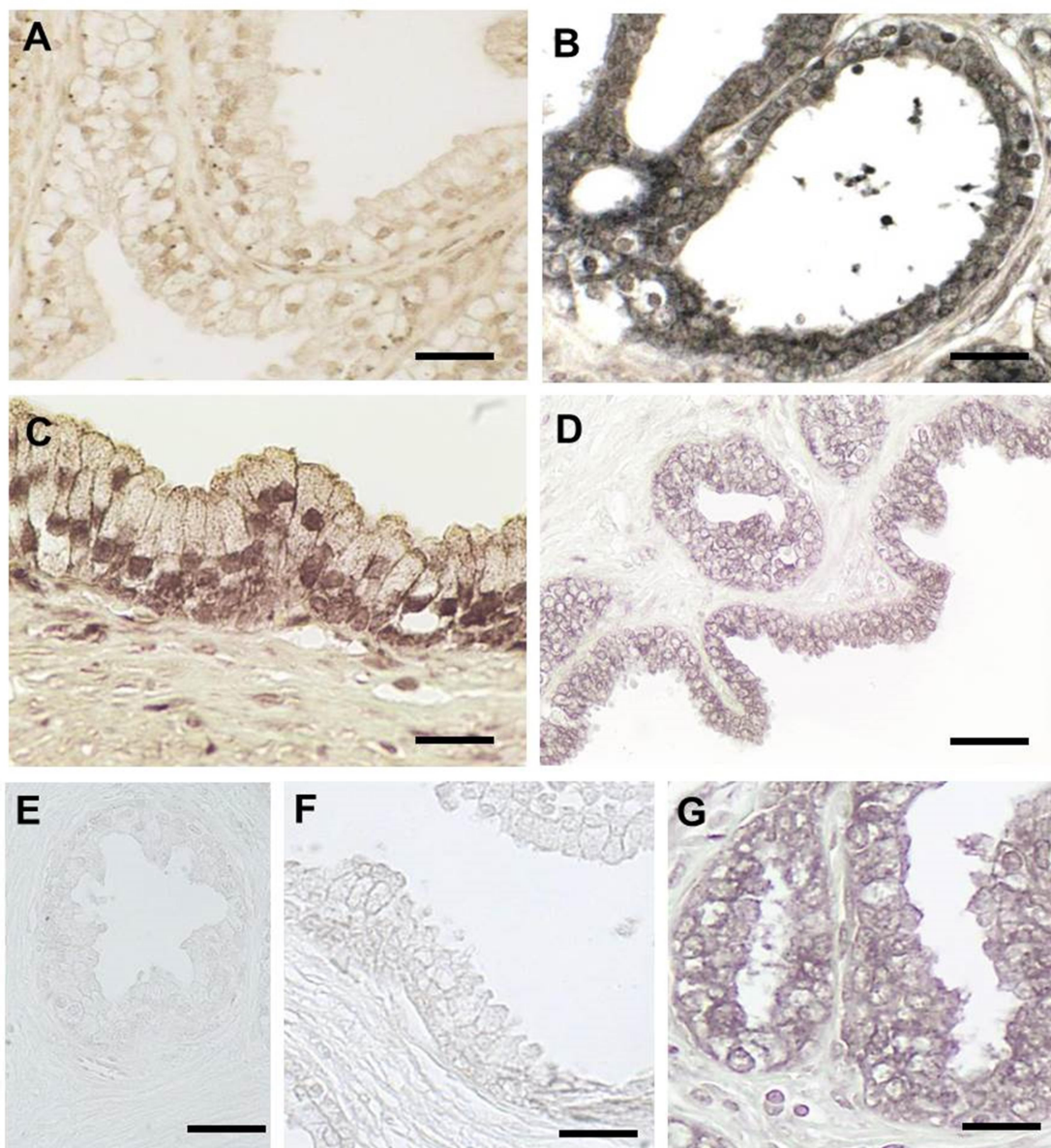


Figura 30. Expresión en ERK-1 (A, B), ERK-2 (C, D), p-ERK (F, G) y control negativo (E). Próstata normal (A, C, E, F) y cáncer (B, D, G) y. Barra: 30 μ m (D, E), 25 μ m (B), 20 μ m A, F, G) y 15 μ m (C).

	ERK-1			ERK-2		
	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.
PN	80.0 (16)	20.24±2.6 ^a	8.45±5.9	100 (20)	30.21±1.77 ^a	10.36±2.2
HBP	80.0 (28)	28.99±2.58 ^b	10.15±2.7	71.4 (25)	46.67±2.01 ^b	13.86±1.7
PIN	86.6 (13)	35.82±2.33 ^c	14.05±4.0	86.6 (13)	58.77±2.33 ^c	13.46±4.5
Cáncer	95.3 (82)	41.5±1.78 ^d	15.60±2.0	68.6 (59)	59.27±1.62	15.64±1.9
	p-ERK					
	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.			
PN	40.0 (8)	18.4±0.31 ^a	12.46±1.3			
HBP	37.1 (13)	19.21±1.01 ^a	15.85±2.6			
PIN	40.0 (6)	23±0.88 ^b	14.32±3.1			
Cáncer	32.6 (28)	23.69±1.81 ^b	15.20±0.8			

Tabla 27. Porcentaje de muestras positivas y densidades ópticas de ERK-1, ERK-2 y p-ERK en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media ± desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

2.2.5 Activación c-myc

c-myc:

En PN y biopsias no hubo señal para c-myc. En HBP, el 92.9% de las muestras positivas presentaron señal nuclear en las células glandulares y algunas estromáticas. En PIN (Figura 31A) y en cáncer (Figura 31B-C) también se observó en el núcleo de células glandulares y estromáticas pero con mayor densidad. En HBP el porcentaje de pacientes positivos fue mayor comparado con PIN y cáncer (Tabla 28). De las muestras positivas para c-myc, el 71.8% no presentaron invasión perineural.

Ki67:

En PN, HBP, PIN (Figura 31D) y cáncer (Figura 31E-F) la inmunotinción fue débil en el citoplasma de las células epiteliales y estromales. El porcentaje de muestras positivas aumenta con la patología para Ki67 (Tabla 28). En biopsias el 44.4% de las muestras son positivas al adquirir la patología. En PN, HBP y PIN la densidad óptica es similar en el núcleo y en cáncer disminuye.

	c-myc			Ki67		
	% (n) de Casos positivos	Citoplasma D.O.	Núcleo D.O.	% (n) de Casos positivos	Citoplasma D.O.	Núcleo D.O.
PN	0	----	----	33.3 (7)	----	9.9±2.3
HBP	92.9 (33)	----	14.51±2.7 ^a	55.7 (19)	----	10.9±2.3
PIN	80.0 (12)	----	20.25±3.1 ^b	44.4 (7)	----	12.4±1.7
Cáncer	82.6 (71)	----	22.10±3.8 ^b	66.3 (57)	----	3.6±1.7

Tabla 28. Porcentaje de muestras positivas y densidades ópticas de c-myc y Ki67 en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: Densidades ópticas (media ± desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

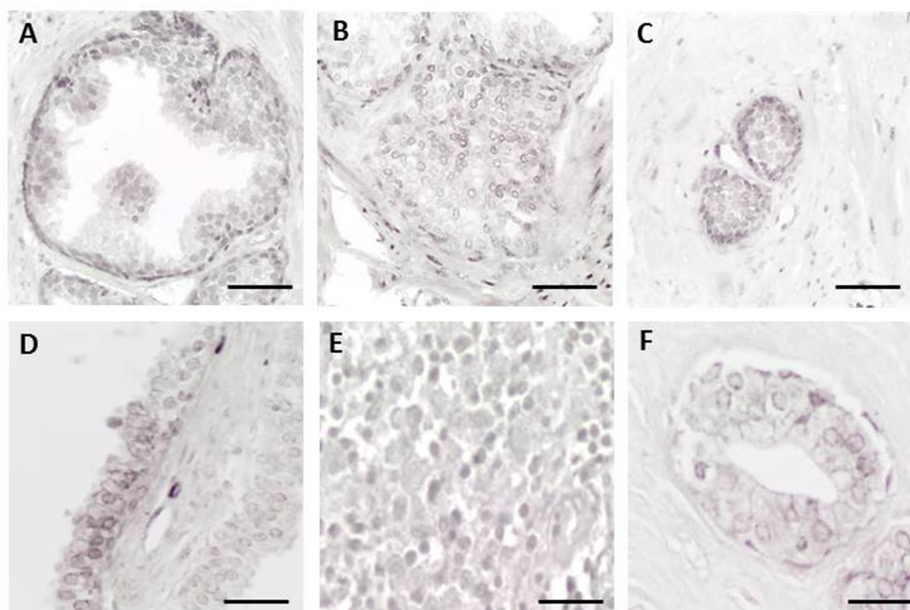


Figura 31. Expresión de c-myc (A-C) y Ki67 (D-F) en PIN (A, D) y cáncer (B-C y E-F). Barra: 15 μ m (F-H), 20 μ m (A), 25 μ m (B, C).

2.2.6 Activación IAP

IAP 1/2:

En todos los grupos la señal apareció en el citoplasma de las células epiteliales (Tabla 29). En PN (Figura 32A), HBP (Figura 32B) y PIN la densidad óptica fue similar. En cáncer (Figura 32C) la D.O. fue mayor. El 69.2% de las muestras positivas para IAP 1/2 los pacientes no presentaron progresión bioquímica.

c-IAP-2:

El porcentaje de muestras positivas disminuyó con la patología (Tabla 29). En PN (Figura 32D), BPH, PIN (Figura 32E) y cáncer (Figura 32F) la inmunotinción fue débil en la región perinuclear. La densidad óptica aumentó en las muestras patológicas en el núcleo. La D.O. en cáncer también aumentó en el citoplasma.

	IAP 1/2			c-IAP-2		
	% (n) de Casos positivos	Citoplasma D.O.	Núcleo D.O.	% (n) de Casos positivos	Citoplasma D.O.	Núcleo D.O.
PN	80.0 (16)	19.64±1.06 ^a	----	60.0 (12)	----	8.94±0.61 [#]
HBP	57.1 (20)	18.36±3.29 ^a	----	57.1 (20)	4.3±6.6 ^a	14.30±1.2 [*]
PIN	60.0 (9)	18.91±1.69 ^a	4.4±4.2	46.6 (7)	5.0±3.4 ^a	15.33±1.52 [*]
Cáncer	75.6 (65)	29.5 ±4.7 ^b	6.36±2.38	47.7 (41)	15.1±7.2 ^b	19.08±2.16 [§]

Tabla 29. Porcentaje de muestras positivas y densidades ópticas de IAP 1/2 y c-IAP-2 en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media ± desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

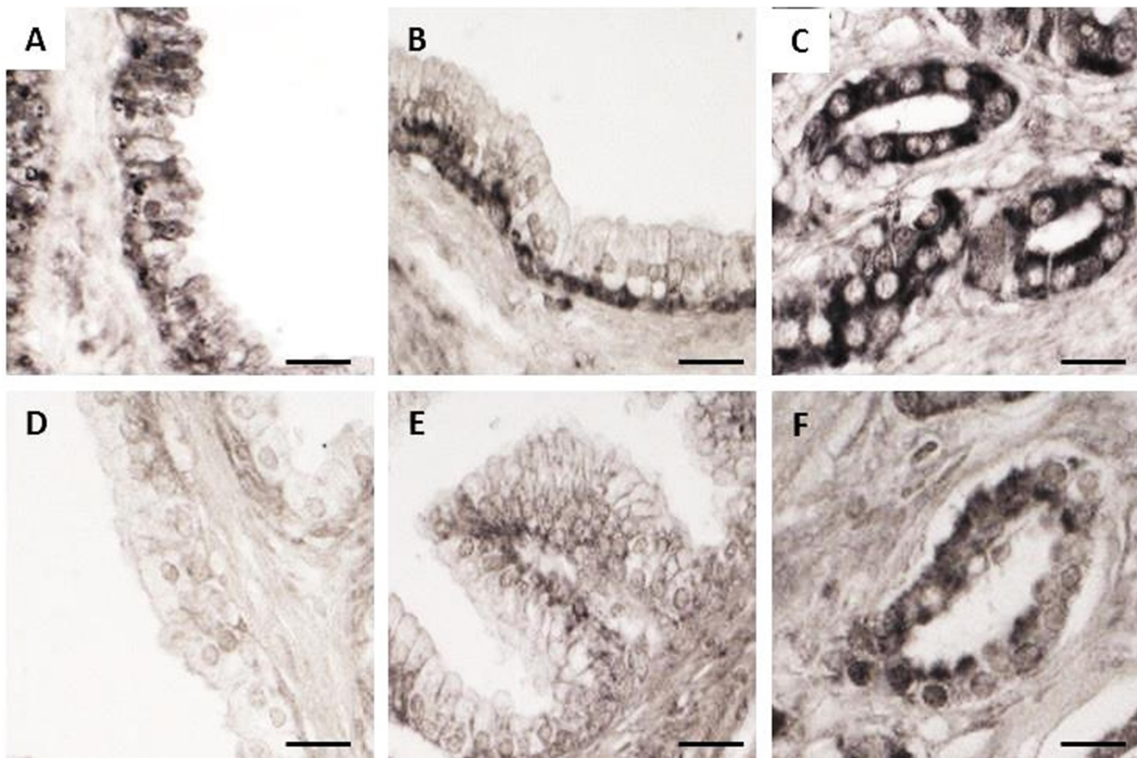


Figura 32. Expresión de IAP 1/2 (A-C) y c-IAP-2 (D-F) en próstata normal (A, D), HBP (B), PIN (E) y cáncer (C, F). Barra: 20 μ m.

2.3 Proporción de pacientes con inmunotinción positiva para la vía de transducción EGF/IL-6/MEK/ERK en el estroma y tumor en la cohorte estudiada

Mediante inmunohistoquímica se determinó el porcentaje de pacientes positivos en el estroma y tumor para cada uno de los factores estudiados y se asignaron valores relativos a la intensidad de tinción positivos bajos y positivos altos (Tabla 30).

	Estroma			Tumor		
	Expresión	Intensidad		Expresión	Intensidad	
	Positivo % (n)	P. bajo % (n)	P. alto % (n)	Positivo % (n)	P. bajo % (n)	P. alto % (n)
EGF	26.7(23)	14.0(12)	12.7(11)	43.0(37)	30.2(26)	12.8(11)
EGFR	91.9(79)	40.7(35)	51.2(44)	97.7(84)	14.0(12)	83.7(72)
IL-6	23.3(20)	18.6(16)	4.7(4)	43.0(37)	30.2(26)	12.8(11)
Gp-130	62.8(54)	33.7(29)	29.1(25)	86.0(74)	14.0(12)	72.1(62)
Raf-1	52.3(45)	30.2(26)	22.1(19)	48.8(42)	12.8(11)	36.0(31)
Rb	40.7(35)	33.7(29)	7.0(6)	34.9(50)	26.7(23)	8.1(7)
pRb	97.7(84)	7.0(6)	90.7(78)	93.0(80)	1.2(1)	91.9(79)
MEK-1	59.3(51)	26.7(23)	32.6(28)	54.7(47)	20.9(18)	33.7(29)
p-MEK	57.0(49)	1.2(1)	55.8(48)	58.1(50)	1.2(1)	57.0(49)
ERK-1	95.3(82)	10.5(9)	84.9(73)	94.2(81)	1.2(1)	93.0(80)
ERK-2	61.6(53)	16.3(14)	45.3(39)	68.6(59)	8.1(7)	60.5(52)
p-ERK	29.1(25)	15.1(13)	14.0(12)	30.2(26)	9.3(8)	20.9(18)
c-myc	80.2(69)	31.4(27)	48.8(42)	79.1(68)	23.3(20)	55.8(48)
Ki67	64.0(55)	33.7(29)	30.6(26)	58.1(50)	30.2(26)	27.9(24)
IAP 1/2	72.1(62)	19.8(17)	52.3(45)	74.4(64)	10.5(9)	64.0(55)
c-IAP-2	44.2(38)	16.3(14)	27.9(24)	38.4(33)	15.1(13)	23.3(20)

Tabla 30. Distribución de la frecuencia de pacientes con inmunotinción positiva para la vía EGF/IL-6 /MEK/ERK según resultados de la técnica de inmunohistoquímica. Se detallan los pacientes positivos y dentro de estos, aquellos con positivo bajo y positivo alto en cuanto a la intensidad del marcaje en las células del estroma y tumor.

2.4. Correlación entre la expresión en el estroma y tumor de los componentes de la vía de transducción EGF/IL-6/MEK/ERK con las características clínico-patológicas en cáncer de próstata

Para correlacionar los componentes de la vía de EGF/IL-6/MEK/ERK con los marcadores clásicos establecidos, se realizó el test de Spearman, para determinar el grado de relación entre las variables.

2.4.1 Correlación entre la expresión de la inmunohistoquímica en el estroma y los marcadores clásicos.

No se encontró ninguna asociación significativa en la expresión en estroma para IL-6, gp-130, MEK-1, p-MEK, ERK-2, c-myc y c-IAP-2 (Tabla 31). Existe una correlación significativa inversa entre la expresión en el estroma de EGF con el estadio T patológico y la puntuación Gleason; entre EGFR con la invasión perineural; entre Rb con la puntuación Gleason; entre pRb con estadio T patológico; entre ERK-1 con la implicación de ganglios;

entre p-ERK con la supervivencia; y entre Ki67 con el PSA sérico preoperatorio. En el estroma la expresión de Raf-1 mostro una relación directa con el estadio T clínico; y entre p-ERK e IAP1/2 con el estadio T patológico.

	PSA sérico preoperatorio		Estadio T patológico		Estadio T clínico		Puntuación Gleason	
	r	p	r	p	r	p	r	p
EGF	-0.039	0.723	-0.228	0.035	-0.128	0.239	-0.208	0.054
EGFR	0.131	0.230	-0.040	0.714	0.015	0.892	0.034	0.758
IL-6	0.069	0.526	-0.013	0.908	0.107	0.328	0.110	0.315
Gp-130	-0.177	0.103	0.124	0.255	0.121	0.266	0.100	0.358
Raf-1	-0.038	0.730	-0.025	0.817	0.262	0.015	-0.175	0.107
Rb	-0.118	0.281	-0.078	0.473	0.006	0.956	-0.256	0.017
pRb	-0.116	0.288	-0.254	0.018	-0.169	0.119	0.071	0.516
MEK-1	-0.080	0.466	-0.098	0.367	-0.054	0.624	-0.056	0.610
p-MEK	0.130	0.232	-0.188	0.083	-0.058	0.598	-0.034	0.757
ERK-1	-0.51	0.642	-0.102	0.352	-0.021	0.850	-0.189	0.081
ERK-2	-0.094	0.387	0.075	0.491	0.142	0.191	-0.141	0.194
p-ERK	0.107	0.325	0.241	0.025	-0.017	0.874	-0.024	0.824
c-myc	-0.008	0.943	0.046	0.675	-0.017	0.879	-0.157	0.150
Ki67	-0.211	0.052	-0.025	0.818	0.051	0.638	0.026	0.812
IAP 1/2	0.019	0.863	0.295	0.006	0.150	0.168	0.081	0.458
c-IAP-2	-0.015	0.893	-0.048	0.663	-0.058	0.596	-0.039	0.723

	Invasión perineural		Implicación de ganglios		Márgenes quirúrgicos positivos		Progresión bioquímica		Supervivencia	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
EGF	-0.009	0.935	0.116	0.287	-0.045	0.683	-0.098	0.371	0.050	0.645
EGFR	-0.204	0.059	0.066	0.548	-0.027	0.802	0.122	0.262	0.180	0.098
IL-6	0.040	0.711	0.140	0.199	-0.095	0.385	0.015	0.892	-0.022	0.843
Gp-130	-0.024	0.826	0.170	0.118	-0.085	0.436	-0.062	0.574	-0.187	0.085
Raf-1	-0.054	0.619	0.100	0.358	0.035	0.749	0.090	0.410	-0.160	0.142
Rb	-0.126	0.247	-0.183	0.092	0.076	0.484	-0.140	0.198	0.034	0.755
pRb	0.093	0.393	0.034	0.755	-0.196	0.071	0.110	0.313	0.093	0.393
MEK-1	-0.034	0.755	-0.042	0.702	0.167	0.124	-0.010	0.928	0.019	0.860
p-MEK	0.101	0.357	0.080	0.462	0.010	0.930	-0.076	0.489	-0.165	0.130
ERK-1	0.009	0.937	-0.213	0.049	-0.053	0.629	0.041	0.710	0.133	0.221
ERK-2	0.099	0.366	-0.053	0.629	0.033	0.766	0.006	0.953	-0.009	0.931
p-ERK	0.192	0.077	0.102	0.351	-0.031	0.775	-0.023	0.831	-0.213	0.049
c-myc	0.036	0.742	-0.029	0.791	0.091	0.402	-0.140	0.198	-0.030	0.785
Ki67	0.125	0.250	0.051	0.642	-0.055	0.615	-0.079	0.468	-0.039	0.723
IAP 1/2	0.025	0.823	0.014	0.896	-0.095	0.382	-0.050	0.649	-0.093	0.396
c-IAP-2	0.044	0.686	-0.085	0.435	0.068	0.532	-0.040	0.712	-0.167	0.124

Tabla 31. Correlación entre la expresión en el estroma de los componentes de la vía EGF/IL-6 /MEK/ERK y las características clínico patológicas de cáncer de próstata (prueba de Spearman). Los valores en negrita resalta la significancia estadística (p<0.05).

2.4.2 Correlación entre la expresión de la inmunohistoquímica en el tumor y los marcadores clásicos.

La expresión en el tumor de los componentes de la ruta EGFR, IL-6, pRb, MEK-1, p-MEK, ERK-1, ERK-2 y Ki67 no presentó ninguna significación con los marcadores clásicos del cáncer de próstata (Tabla 32). La expresión en el tumor presentó una correlación significativa e inversa entre EGF, gp-130, p-ERK y c-IAP-2 con la supervivencia; entre Rb y c-myc con puntuación Gleason. En el tumor hubo una correlación significativa directa entre la expresión de gp-130 y Raf-1 con estadio T clínico; entre p-ERK e IAP1/2 con el estadio T patológico; y entre p-ERK con el PSA sérico preoperatorio.

	PSA sérico preoperatorio		Estadio T patológico		Estadio T clínico		Puntuación Gleason	
	r	p	r	p	r	p	r	p
EGF	0.016	0.880	-0.159	0.143	0.010	0.924	-0.028	0.798
EGFR	0.045	0.682	0.112	0.305	-0.014	0.895	0.071	0.518
IL-6	-0.081	0.457	-0.112	0.305	0.010	0.924	-0.028	0.798
Gp-130	0.047	0.666	0.158	0.148	0.299	0.005	0.008	0.940
Raf-1	-0.090	0.409	0.025	0.817	0.278	0.010	-0.081	0.457
Rb	-0.162	0.136	0.008	0.944	-0.030	0.787	-0.208	0.055
pRb	0.080	0.466	0.107	0.326	-0.026	0.815	0.126	0.248
MEK-1	-0.100	0.359	-0.123	0.258	-0.062	0.573	-0.074	0.500
p-MEK	0.148	0.173	-0.159	0.145	-0.079	0.468	0.017	0.874
ERK-1	-0.083	0.447	-0.055	0.613	0.027	0.807	-0.148	0.175
ERK-2	-0.143	0.190	0.070	0.520	0.163	0.133	-0.151	0.165
p-ERK	0.231	0.033	0.271	0.012	0.011	0.923	-0.102	0.348
c-myc	0.030	0.781	0.066	0.548	0.009	0.932	-0.291	0.007
Ki67	-0.146	0.176	0.108	0.321	0.063	0.566	0.017	0.874
IAP1/2	0.004	0.972	0.211	0.051	0.106	0.332	0.059	0.591
c-IAP-2	0.045	0.684	-0.075	0.491	-0.142	0.191	-0.048	0.663

	Invasión perineural		Implicación de ganglios		Márgenes quirúrgicos positivos		Progresión bioquímica		Supervivencia	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
EGF	0.112	0.306	0.031	0.776	-0.058	0.597	-0.123	0.259	-0.260	0.016
EGFR	-0.081	0.458	0.034	0.755	-0.037	0.736	0.110	0.313	0.093	0.393
IL-6	-0.154	0.158	-0.080	0.462	-0.010	0.930	-0.024	0.829	-0.048	0.664
Gp-130	-0.136	0.213	0.089	0.415	0.042	0.703	0.074	0.497	-0.212	0.051
Raf-1	-0.012	0.911	0.116	0.289	0.090	0.409	0.140	0.200	-0.170	0.118
Rb	-0.056	0.606	-0.162	0.137	0.075	0.494	-0.058	0.598	-0.167	0.125
pRb	0.062	0.568	0.060	0.580	0.028	0.795	0.195	0.071	0.165	0.128
MEK-1	0.023	0.836	-0.021	0.850	0.190	0.079	-0.091	0.403	-0.083	0.448
p-MEK	0.140	0.199	0.075	0.490	0.039	0.718	-0.043	0.695	-0.126	0.246
ERK-1	-0.074	0.496	-0.181	0.095	-0.110	0.311	-0.033	0.763	0.038	0.729
ERK-2	0.069	0.527	-0.089	0.418	0.019	0.865	-0.047	0.664	-0.044	0.687
p-ERK	0.174	0.109	0.095	0.384	0.001	0.991	0.012	0.909	-0.226	0.036
c-myc	-0.077	0.483	-0.022	0.840	0.112	0.304	-0.117	0.285	-0.141	0.195
Ki67	0.193	0.075	-0.036	0.739	-0.057	0.599	-0.043	0.695	-0.020	0.856
IAP1/2	0.053	0.627	0.003	0.979	-0.031	0.780	-0.089	0.414	-0.067	0.539
c-IAP-2	0.063	0.562	-0.061	0.579	0.017	0.880	-0.108	0.324	-0.207	0.056

Tabla 32. Correlación entre la expresión en el tumor de los componentes de la vía EGF/IL-6 /MEK/ERK y las características clínico patológicas de cáncer de próstata (prueba de Spearman). Los valores en negrita resalta la significancia estadística (p<0.05).

2.4.3 Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el estroma y los marcadores clásicos.

En el estroma, al evaluar la correlación de la intensidad con los marcadores clásicos, no se encontró ninguna relación significativa para EGFR, IL-6, pRb, MEK-1, p-MEK, ERK-2, c-myc, Ki67, AIP 1/2 y c-IAP-2 (Tabla 33). La intensidad de la inmunohistoquímica en el estroma presentó una correlación positiva entre gp-130 con la implicación de ganglios; entre Raf-1 con el estadio T clínico; y entre p-ERK con el estadio T patológico. En el estroma la intensidad de EGF presentó una relación inversa con el estadio T patológico; entre Rb y EGF con la puntuación Gleason; y entre ERK-1 con los márgenes quirúrgicos.

	PSA sérico preoperatorio		Estadio T patológico		Estadio T clínico		Puntuación Gleason	
	r	p	r	p	r	p	r	p
EGF	-0.034	0.756	-0.238	0.028	-0.138	0.204	-0.225	0.047
EGFR	-0.015	0.889	0.122	0.264	0.089	0.415	0.079	0.471
IL-6	0.072	0.512	-0.018	0.872	0.104	0.343	0.109	0.318
Gp-130	-0.027	0.802	0.178	0.102	0.094	0.387	0.157	0.150
Raf-1	-0.079	0.471	-0.030	0.783	0.223	0.039	-0.137	0.209
Rb	-0.124	0.257	-0.037	0.736	0.030	0.785	-0.260	0.016
pRb	0.004	0.972	-0.128	0.242	0.041	0.707	-0.059	0.591
MEK-1	-0.099	0.363	-0.080	0.466	-0.025	0.819	-0.097	0.372
p-MEK	0.121	0.268	-0.179	0.099	-0.046	0.676	-0.028	0.799
ERK-1	-0.113	0.301	-0.050	0.647	0.054	0.624	-0.076	0.485
ERK-2	-0.018	0.873	0.163	0.134	0.134	0.219	-0.099	0.363
p-ERK	0.096	0.380	0.219	0.042	-0.035	0.742	-0.022	0.838
c-myc	-0.034	0.753	0.037	0.737	0.027	0.804	-0.075	0.491
Ki67	-0.205	0.059	-0.026	0.809	0.010	0.927	0.033	0.765
AIP1/2	-0.018	0.868	0.199	0.066	0.112	0.304	-0.003	0.980
c-IAP-2	0.045	0.683	-0.079	0.468	-0.118	0.280	-0.058	0.596

	Invasión perineural		Implicación de ganglios		Márgenes quirúrgicos positivos		Progresión bioquímica		Supervivencia	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
EGF	-0.009	0.935	0.116	0.287	-0.042	0.704	-0.109	0.317	0.029	0.794
EGFR	-0.042	0.701	0.111	0.310	-0.045	0.683	0.083	0.449	0.057	0.559
IL-6	0.052	0.636	0.157	0.148	-0.097	0.375	0.023	0.834	-0.022	0.844
Gp-130	-0.006	0.959	0.225	0.038	-0.042	0.698	-0.051	0.641	-0.169	0.119
Raf-1	-0.093	0.393	0.188	0.083	0.042	0.699	0.128	0.240	-0.170	0.117
Rb	-0.107	0.328	-0.179	0.098	0.103	0.347	-0.148	0.173	0.018	0.867
pRb	0.017	0.878	-0.115	0.292	-0.004	0.972	-0.020	0.857	0.017	0.878
MEK-1	0.023	0.837	0.017	0.879	0.187	0.084	-0.018	0.870	-0.031	0.777
p-MEK	0.109	0.318	0.084	0.444	-0.007	0.947	-0.067	0.543	-0.187	0.084
ERK-1	0.034	0.756	-0.077	0.482	-0.259	0.016	0.029	0.793	0.045	0.680
ERK-2	0.036	0.740	-0.015	0.895	0.045	0.681	0.056	0.608	0.043	0.693
p-ERK	0.176	0.106	0.137	0.210	-0.036	0.745	-0.036	0.742	-0.201	0.064
c-myc	0.044	0.685	0.076	0.485	0.067	0.540	-0.060	0.584	0.100	0.359
Ki67	0.048	0.662	0.018	0.871	-0.118	0.281	-0.071	0.516	0.008	0.939
AIP1/2	0.009	0.936	-0.001	0.991	-0.080	0.461	-0.026	0.811	-0.147	0.176
c-IAP-2	0.021	0.846	-0.065	0.554	0.084	0.442	-0.030	0.785	-0.148	0.174

Tabla 33. Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el estroma de los componentes de la vía EGF/IL-6 /MEK/ERK y las características clínico patológicas de cáncer de próstata (prueba de Spearman). Los valores en negrita resalta la significancia estadística (p<0.05).

2.4.4 Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el tumor y los marcadores clásicos.

Al realizar la correlación de la intensidad de la inmunohistoquímica de IL-6, pRb, MEK-1, p-MEK, ERK-1, ERK-2, c-myc, Ki67 e IAP 1/2 con los marcadores clásicos, no se encontró ninguna asociación significativa en esta cohorte (Tabla 34). La intensidad en el tumor de EGF, Raf-1, p-ERK y c-IAP-2 mostró una relación inversa con la supervivencia; y Rb con la puntuación Gleason. La intensidad de la inmunohistoquímica en el tumor de EGFR, gp-130 y Raf-1 presentó una relación directa con el estadio T clínico; y entre p-ERK con el PSA sérico preoperatorio y el estadio T patológico.

	PSA sérico preoperatorio		Estadio T patológico		Estadio T clínico		Puntuación Gleason	
	r	p	r	p	r	p	r	p
EGF	0.034	0.759	-0.153	0.158	-0.050	0.648	0.004	0.970
EGFR	-0.064	0.559	0.073	0.505	0.206	0.058	0.121	0.266
IL-6	-0.090	0.411	-0.114	0.298	0.009	0.934	-0.047	0.665
Gp-130	-0.112	0.307	0.047	0.665	0.280	0.009	0.129	0.238
Raf-1	-0.119	0.274	0.041	0.709	0.257	0.017	-0.090	0.409
Rb	-0.155	0.155	0.015	0.892	0.004	0.971	-0.215	0.047
pRb	0.045	0.679	0.050	0.646	-0.068	0.537	0.033	0.766
MEK-1	-0.051	0.644	-0.150	0.167	-0.042	0.704	-0.172	0.112
p-MEK	0.139	0.203	-0.149	0.170	-0.067	0.539	0.024	0.829
ERK-1	-0.020	0.856	-0.020	0.854	0.064	0.559	-0.117	0.282
ERK-2	-0.161	0.139	0.056	0.611	0.106	0.333	-0.185	0.088
p-ERK	0.219	0.043	0.239	0.026	-0.009	0.932	-0.103	0.347
c-myc	0.022	0.842	0.107	0.325	0.047	0.666	-0.165	0.129
Ki67	-0.131	0.228	0.114	0.298	-0.006	0.956	-0.028	0.800
IAP1/2	0.032	0.773	0.062	0.569	0.036	0.742	-0.009	0.936
c-IAP-2	0.074	0.496	-0.078	0.474	-0.161	0.138	-0.047	0.667

	Invasión perineural		Implicación de ganglios		Márgenes quirúrgicos positivos		Progresión bioquímica		Supervivencia	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
EGF	0.096	0.382	0.049	0.655	-0.073	0.502	-0.119	0.277	-0.262	0.015
EGFR	-0.023	0.833	0.097	0.373	-0.168	0.121	0.119	0.275	-0.150	0.167
IL-6	-0.128	0.239	-0.045	0.680	-0.033	0.766	-0.014	0.898	-0.017	0.879
Gp-130	-0.058	0.597	0.136	0.213	0.018	0.867	0.113	0.299	-0.124	0.257
Raf-1	0.010	0.928	0.151	0.164	0.080	0.465	0.144	0.186	-0.210	0.053
Rb	-0.030	0.787	-0.159	0.144	0.073	0.505	-0.058	0.593	-0.167	0.124
pRb	-0.007	0.951	0.066	0.548	0.058	0.596	0.129	0.238	0.090	0.408
MEK-1	-0.006	0.954	-0.032	0.767	0.139	0.203	-0.126	0.247	-0.098	0.368
p-MEK	0.118	0.279	0.079	0.471	0.050	0.645	-0.033	0.760	-0.119	0.277
ERK-1	-0.043	0.693	-0.159	0.144	-0.157	0.149	0.000	1.000	0.061	0.576
ERK-2	0.029	0.793	-0.064	0.556	0.074	0.498	-0.036	0.745	-0.049	0.654
p-ERK	0.173	0.111	0.116	0.288	-0.029	0.793	0.009	0.937	-0.224	0.038
c-myc	-0.060	0.582	0.057	0.602	0.097	0.376	0.028	0.801	-0.123	0.260
Ki67	0.115	0.291	0.028	0.795	-0.043	0.693	-0.057	0.601	-0.053	0.627
IAP1/2	-0.051	0.640	0.038	0.728	-0.159	0.144	-0.161	0.138	-0.170	0.119
c-IAP-2	0.060	0.580	-0.085	0.438	0.018	0.867	-0.132	0.225	-0.222	0.040

Tabla 34. Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el tumor de los componentes de la vía EGF/IL-6 /MEK/ERK y las características clínico patológicas de cáncer de próstata (prueba de Spearman). Los valores en negrita resalta la significancia estadística (p<0.05).

2.5 Correlación de la expresión de la vía EGF/IL-6/MEK/ERK con el tiempo de recurrencia bioquímica (análisis de supervivencia)

Mediante el análisis de Kaplan-Meier y el test del *log-rank* no se encontró ningún resultado significativo para la expresión en el estroma y tumor de los componentes de la vía EGF/IL-6/MEK/ERK. El modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox unifactorial (Tabla 35) corroboraron los datos obtenidos en el análisis de Kaplan-Meier.

Estroma	p	RR (IC 95%)	Tumor	p	RR (IC 95%)
EGF	0.364	0.660 (0.269-1.621)	EGF	0.262	0.645 (0.300-1.387)
EGFR	0.274	3.043 (0.414 - 22.36)	EGFR	0.219	2.000 (0.662-6.036)
IL-6	0.835	1.095 (0.467-2.563)	IL-6	0.661	0.847 (0.405-1.775)
Gp-130	0.553	0.800 (0.382-1.675)	Gp-130	0.438	1.605 (0.489-5.604)
Raf-1	0.423	1.352 (0.646-2.832)	Raf-1	0.210	1.605 (0.766-3.362)
Rb	0.190	0.591 (0.269-1.299)	Rb	0.587	0.804 (0.366-1.766)
pRb	0.540	20.99 (0.001-359190)	pRb	0.283	23.07 (0.075-7142)
MEK-1	0.864	0.938 (0.448-1.964)	MEK-1	0.326	0.694 (0.335-1.439)
p-MEK	0.429	0.745 (0.359-1.545)	p-MEK	0.644	0.841 (0.405-1.750)
ERK-1	0.667	1.549 (0.211-11.388)	ERK-1	0.939	0.945 (0.225-3.976)
ERK-2	0.836	1.082 (0.511-2.292)	ERK-2	0.825	0.917 (0.426-1.973)
p-ERK	0.975	0.987 (0.437-2.229)	p-ERK	0.813	1.100 (0.501-2.415)
c-myc	0.168	0.563 (0.249-1.273)	c-myc	0.240	0.614 (0.272-1.386)
Ki67	0.487	0.769 (0.367-1.611)	Ki67	0.737	0.882 (0.424-1.834)
IAP1/2	0.567	0.795 (0.362-1.746)	IAP1/2	0.346	0.685 (0.312-1.504)
c-IAP-2	0.569	0.807 (0.385-1.689)	c-IAP-2	0.242	0.625 (0.284-1.373)

Tabla 35. Análisis de Cox unifactorial de la expresión en estroma y tumor de marcadores de la vía EGF/IL-6/MEK/ERK en estudio para el tiempo de recurrencia bioquímica. R: razón de riesgo; IC: intervalo de confianza.

En el análisis de la intensidad en el estroma y tumor tampoco se obtuvieron datos significativos ni con Kaplan-Meier ni con el test del *log-rank*. El modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox unifactorial (Tabla 36) corroboró los datos obtenidos en el análisis de Kaplan-Meier.

Estroma	p	RR (IC 95%)	Tumor	p	RR (IC 95%)
EGF	0.255	0.706 (0.388-1.285)	EGF	0.309	0.748 (0.427-1.309)
EGFR	0.365	1.313 (0.728-2.368)	EGFR	0.219	2.000 (0.662-6.036)
IL-6	0.633	0.916 (0.613-2.238)	IL-6	0.738	0.916 (0.547-1.534)
Gp-130	0.585	0.882 (0.562-1.384)	Gp-130	0.257	1.397 (0.783-2.461)
Raf-1	0.205	1.336 (0.853-2.092)	Raf-1	0.193	1.296 (0.877-1.915)
Rb	0.158	0.622 (0.322-1.203)	Rb	0.535	0.829 (0.460-1.497)
pRb	0.868	1.086 (0.413-2.856)	pRb	0.283	23.07 (0.075-7142)
MEK-1	0.821	0.952 (0.620-1.462)	MEK-1	0.174	0.745 (0.488-1.138)
p-MEK	0.471	0.874 (0.605-1.261)	p-MEK	0.699	0.930 (0.643-1.345)
ERK-1	0.635	1.208 (0.553-2.639)	ERK-1	0.939	1.029 (0.429-2.154)
ERK-2	0.514	1.144 (0.763-1.716)	ERK-2	0.854	0.964 (0.652-1.426)
p-ERK	0.781	0.928 (0.549-1.569)	p-ERK	0.891	1.031 (0.664-1.603)
c-myc	0.471	0.842 (0.527-1.345)	c-myc	0.916	0.975 (0.614-1.550)
Ki67	0.572	0.877 (0.555-1.384)	Ki67	0.657	0.903 (0.577-1.415)
IAP1/2	0.603	0.896 (0.591-1.357)	IAP1/2	0.132	0.740 (0.501-1.095)
c-IAP-2	0.641	0.904 (0.592-1.381)	c-IAP-2	0.150	0.700 (0.431-1.138)

Tabla 36: Análisis de Cox unifactorial de la intensidad en estroma y tumor de marcadores de la vía EGF/IL-6/MEK/ERK en estudio para el tiempo de recurrencia bioquímica. RR: razón de riesgo; IC: intervalo de confianza.

3 Estudio comparativo de la expresión de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt en el estroma y tumor en próstata normal y patológica

3.1 Análisis por *Western Blot* de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt en próstata normal, HBP y cáncer de próstata

Mediante Western Blot se comprobó que la especificidad de todos los anticuerpos se correspondía con el peso molecular descrito por la casa comercial.

3.2 Análisis de la expresión de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt en próstata normal, HBP y cáncer de próstata

3.2.1 Activación de TGF-B y sus receptores

TGF-B:

En PN no se expresó TGF-B (Figura 33A). En HBP (Figura 33B) la señal apareció en células basales mientras que en PIN y cáncer (Figura 33C) la inmunotinción fue más intensa en las células epiteliales. En PIN el porcentaje de muestras positivas para TGF-B fue de 86.7% siendo el valor más alto (Tabla 37). Al comparar las densidades ópticas se observó que se incrementaba con la patología.

TGFBRI:

En PN no hubo expresión de TGFBRI. En BPH (Figura 33D) la inmunoreacción fue muy débil destacando la zona perinuclear, sin embargo, en cáncer (Figura 33E-F) fue intensa en el citoplasma de las células epiteliales. Entre las muestras patológicas se hallaron diferencias significativas en el epitelio (Tabla 37). En cáncer y PIN la densidad óptica fue mayor en las células del epitelio glandular.

TGFBRII:

En PN la inmunotinción se observó en las células basales (Figura 33G). En HBP (Figura 33H), PIN y cáncer (Figura 33I) el marcaje fue intenso en las células del epitelio glandular. En los grupos con patología prostática la expresión en el estroma fue baja (Tabla 37). El porcentaje de muestras positivas y la densidad óptica aumento en los grupos con patología.

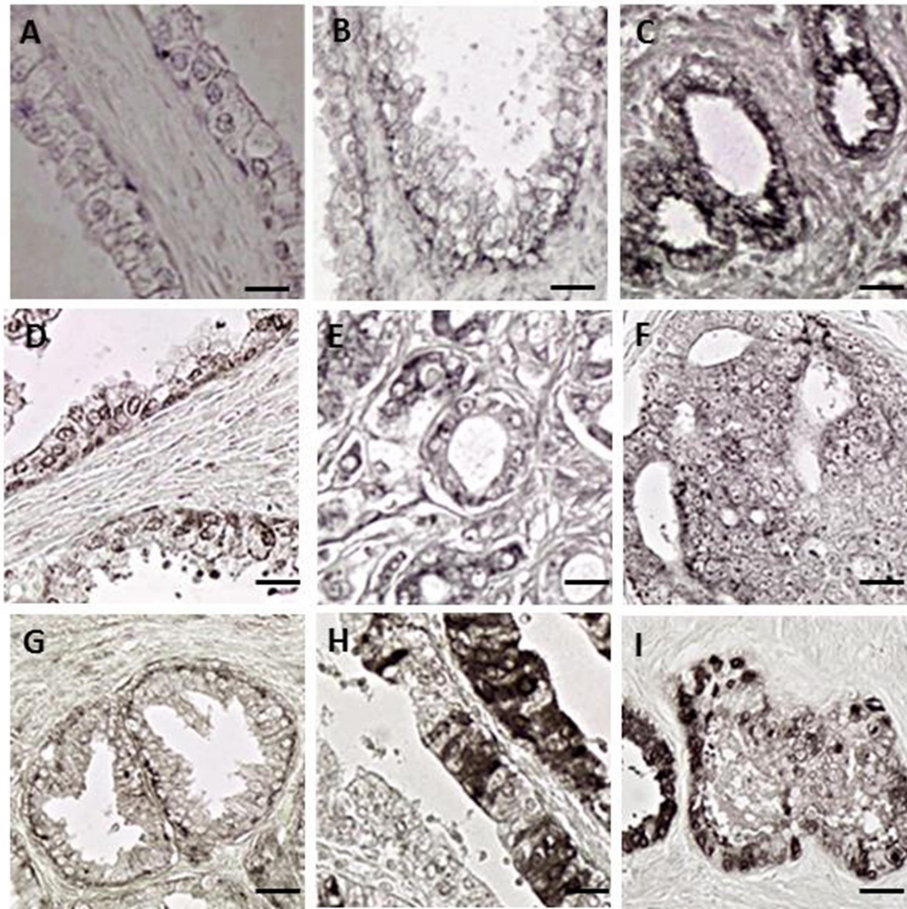


Figura 33. Expresión de TGF-B (A-C), TGFBR1 (D-F) y TGFBR2 (G-I) en próstata normal (A, G), HBP (B, D, H) y cáncer (C, E, F, I). Barra: 20 μm (H) y 25 μm (A-G, I).

	TGF-B			TGFBR1		
	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.
PN	0	-----	-----	0	-----	-----
HBP	37.1 (13)	19.93±2.55 ^a	5.18±3.1	62.8 (22)	17.46±1.64 ^a	6.17±2.7
PIN	86.7 (13)	26.67±2.76 ^b	5.20±3.2	77.3 (11)	27.73±2.6 ^b	5.02±2.4
Cáncer	57.0 (49)	34.15±2.87 ^c	5.44±3.4	62.8 (54)	31.68±2.53 ^b	5.78±2.3
	TGFBR2					
	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.			
PN	40.0 (8)	29.77±1.8 ^a	-----			
HBP	68.6 (24)	41.22±3.8 ^b	5.87±2.7			
PIN	73.3 (11)	35.14±2.66 ^b	5.57±1.6			
Cáncer	84.9 (73)	36.96±2.53 ^c	5.40±1.9			

Tabla 37. Porcentaje de muestras positivas y densidades ópticas de TGF-B, TGFBR1 y TGFBR2 en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media ± desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

3.2.2 Activación PI3K/Akt

PI3K:

Excepto en PN que fue negativo, en todos los grupos el porcentaje de células positivas superó el 93% (Tabla 38). La inmunotinción, siempre fue perinuclear tanto en HBP (Figura 34B), PIN como cáncer (Figura 34C). El grupo de cáncer tuvo la mayor densidad óptica en el epitelio glandular.

p-Akt-Ser:

En PN, HBP (Figura 34D) y PIN el 100% de las muestras de fueron positivas para p-Akt-Ser (Tabla 38). La expresión fue alta y localizada en el núcleo de las células epiteliales. La densidad óptica aumenta con la patología siendo la mayor en cáncer (Figura 34E-F).

p-Akt-Thr:

En PN, HBP y PIN el 100% de las muestras fueron positivas para p-Akt-Thr mientras que en cáncer la positividad disminuyó al 80.2% (Tabla 38). La inmunotinción se detectó en el núcleo de células del epitelio glandular, siendo negativa en los núcleos de las células estromáticas. En HBP la densidad óptica fue mayor (Figura 34G) que en PIN y cáncer (Figura 34H-I).

	PI3K			p-Akt-Ser		
	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) de Casos positivos	Epitelio * D.O.	Estroma * D.O.
PN	-----	-----	-----	100 (20)	67.23±3.5 ^a	-----
HBP	94.3 (33)	7.80±2.4 ^a	-----	100 (35)	77±4.2 ^b	-----
PIN	93.3 (14)	8.75±1.2 ^a	-----	100 (15)	79±1.8	-----
Cáncer	95.3 (82)	12.57±3.8 ^b	-----	90.7 (78)	82±3.2 ^b	-----
	p-Akt-Thr					
	% (n) de Casos positivos	Epitelio * D.O.	Estroma * D.O.			
PN	100 (20)	43±3.2 ^a	-----			
HBP	100 (35)	62±3.6 ^b	-----			
PIN	100 (15)	53±3.5 ^c	-----			
Cáncer	80.2 (69)	55±3.9 ^b	-----			

* % de núcleos marcados

Tabla 38. Porcentaje de muestras positivas y densidades ópticas de PI3K, p-Akt-Ser y p-Akt-Thr en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media ± desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

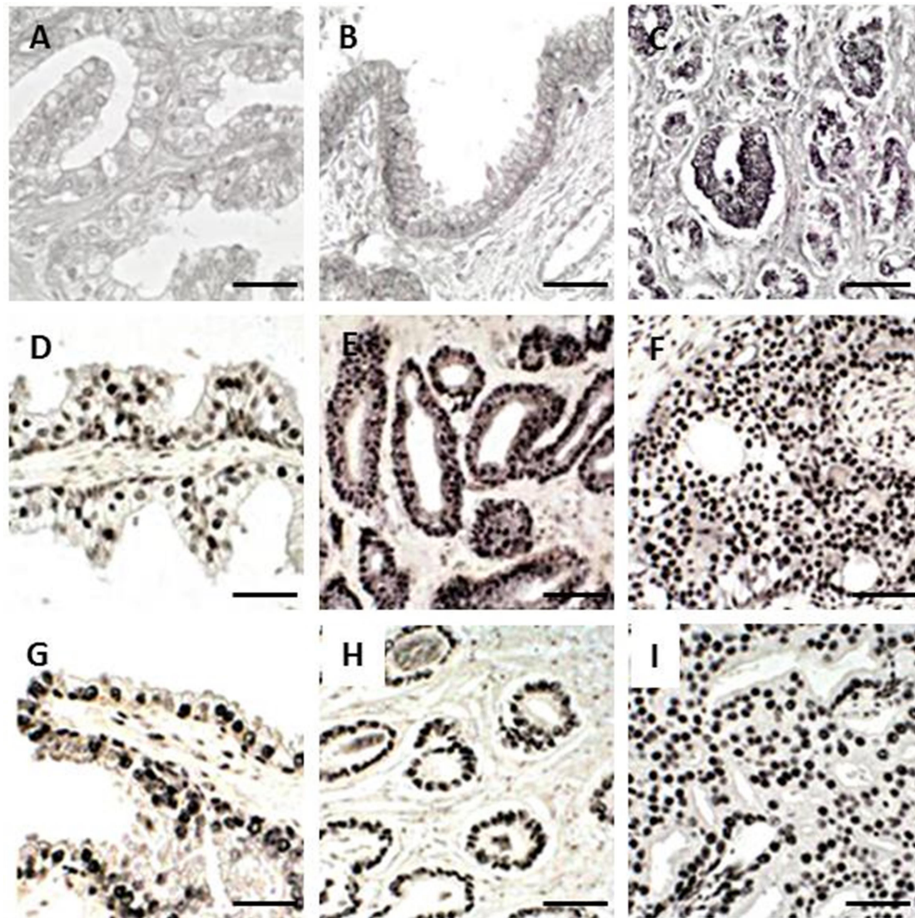


Figura 34. Expresión de PI3K (B-C), p-Akt-Ser (D-F), p-Akt-Thr (G-I), y control negativo (A) en próstata normal (A), HBP (B, D, G) y cáncer (C, E, F, H, I). Barra; 15 μ m (A, C), 20 μ m (D, G), 25 μ m (B, E, F, H, I).

Bad:

El porcentaje de muestras positivas incrementa con la malignidad (Tabla 39). En próstata normal, HBP (Figura 35A) y PIN (Figura 35B), Bad se localizó como una mancha en el citoplasma de las células epiteliales y ocasionalmente en las células del estroma. En las muestras de PIN y cáncer (Figura 35C) la señal se encontró también en los núcleos de muchas células epiteliales. Las densidades ópticas en el epitelio aumentaron con la patología.

Bim:

El porcentaje de muestras positivas aumenta con la patología para Bim (Tabla 39). La inmunotinción se observó en el citoplasma. En muestras sin patología la señal fue perinuclear y poco perceptible. La densidad óptica en el epitelio de HBP (Figura 35D) y PIN (Figura 35E) fue mayor que en PN. La mayor densidad óptica se apreció en cáncer (Figura 35F).

Mcl-1:

Mcl-1 se detectó en el citoplasma de las células epiteliales y algunas del estroma, observándose en las células basales de HBP (Figura 35G) y PIN (Figura 35H). El porcentaje de muestras positivas así como la densidad óptica (Tabla 39) fue superior en PIN y cáncer (Figura 35I).

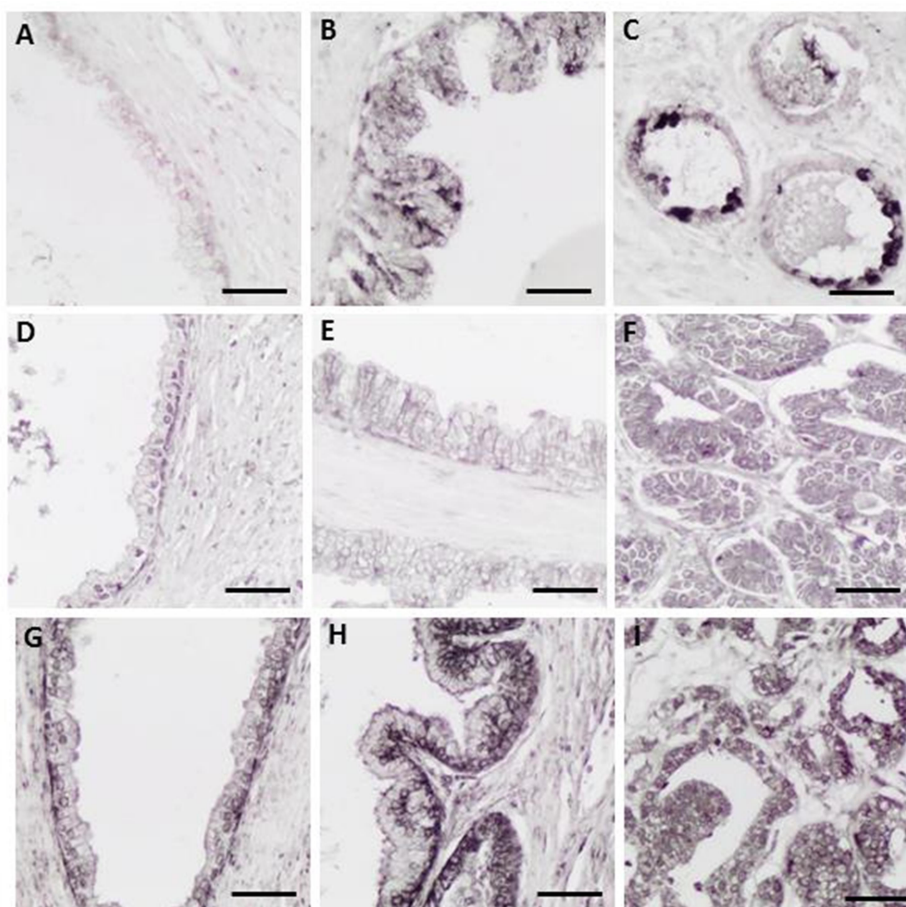


Figura 35. Expresión de Bad (A-C), Bim (D-F) y Mcl-1 (G-I) en HBP (A, D, G), PIN (B, E, H) y cáncer (C, F, I). Barra: 20 μm (A-C, E, F, H, I), 25 μm (D, G).

	Bad			Bim		
	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.
PN	20.0 (4)	8.12±2.10 ^a	2.94±1.75	25.0 (5)	12.30±5.07 ^a	4.64±0.7 [#]
HBP	42.6 (6)	11.9±3.25 ^a	3.13±2.1	71.4 (25)	25.02±5.6 ^b	15.97± 3.02 [*]
PIN	40.0 (6)	39.20±8.08 ^b	6.56±1.25	80.0 (12)	22.97±3.73 ^b	11.43±1.2 [*]
Cáncer	59.3 (51)	37.18±4.56 ^b	5.01±2.23	89.5 (77)	38.55±4.7 ^c	16.66±5.62 [*]
	Mcl-1					
	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.			
PN	40.0 (8)	20.10±2.23 ^a	3.1±0.89			
HBP	28.6 (10)	24.50±2.30 ^a	3.17±1.5			
PIN	100 (15)	29.05±5.2 ^b	4.23±1.9			
Cáncer	86.0 (74)	33.41±1.26 ^b	4.10±2.1			

Tabla 39. Porcentaje de muestras positivas y densidades ópticas de Bad, Bim y Mcl-1 en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media ± desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

3.2.3 Activación Ikk/IkB

Ikk:

El porcentaje de muestras positivas disminuye con la patología para Ikk (Tabla 40). La inmunotinción se observó en los núcleos de las células epiteliales en PN, HBP (Figura 36A) y PIN (Figura 36B). En cáncer (Figura 36C) Ikk se localizó en toda la célula (citoplasma y núcleo). La mayor densidad óptica se observó en cáncer.

p-Ikk:

En PN (Figura 36D) y HBP la inmunohistoquímica para p-Ikk marca muy bien los núcleos epiteliales. En PIN (Figura 36E) y en cáncer (Figura 36F) también se observa en el citoplasma perinuclear. La densidad óptica para p-Ikk aumenta considerablemente en el epitelio del cáncer (Tabla 40).

IkB:

El inmunomarcaje para IkB se observa en el citoplasma de las células epiteliales. En PN (Figura 37G) fue algo más más intenso en la zona basal. La mayor densidad óptica se observó en PIN (Figura 37H) y cáncer (Figura 37I), siendo mayor en cáncer que en PIN (Tabla 40).

p-IkB:

El porcentaje de muestras positivas aumentó con la patología para p-IkB (Tabla 40). En todos los grupos la inmunotinción fue más tenue en el citoplasma de las células apicales, destacando la zona perinuclear y el núcleo. Entre PN (Figura 37J), HBP y PIN (Figura 37K) la densidad óptica es similar incrementándose significativamente en el epitelio de cáncer (Figura 37L).

	Ikk			p-Ikk		
	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.
PN	100 (20)	21.02±4.3 ^a	18.7±3.0 [#]	25 (5)	27.56±4.8 ^a	27.0±2.9
HBP	82.9 (29)	24.55±4.7 ^a	21.87±4.3 [#]	48.57(17)	25.09±1.7 ^a	28.62±2.8
PIN	77.8 (12)	24.16±5.1 ^a	22.37±2.6 [#]	80 (12)	31.63±3.5 ^a	31.09±3.3
Cáncer	73.3 (63)	64.59±3.2 ^b	29.04±3.7 [*]	80.2 (69)	54.02±5.4 ^b	32.87±2.7
	IkB			p-IkB		
	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.
PN	60.0 (12)	32.45±5.4 ^a	18.89±4.7 [#]	40.00 (8)	29.23±5.4 ^a	26.59±3.0
HBP	85.7 (30)	30.45±6.1 ^a	21.24±2.1 [#]	82.85 (29)	30.42±3.9 ^a	20.43±4.7
PIN	62.2 (9)	50.72±3.4 ^b	32.2±5.3 [‡]	66.60 (10)	33.38±5.5 ^a	23.57±3.8
Cáncer	53.5 (46)	59.8±4.0 ^c	36.89±6.4 [‡]	77.90 (67)	78.57±4.9 ^b	23.18±5.2

Tabla 40. Porcentaje de muestras positivas y densidades ópticas de Ikk, p-Ikk, IkB y p-IkB en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media ± desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de

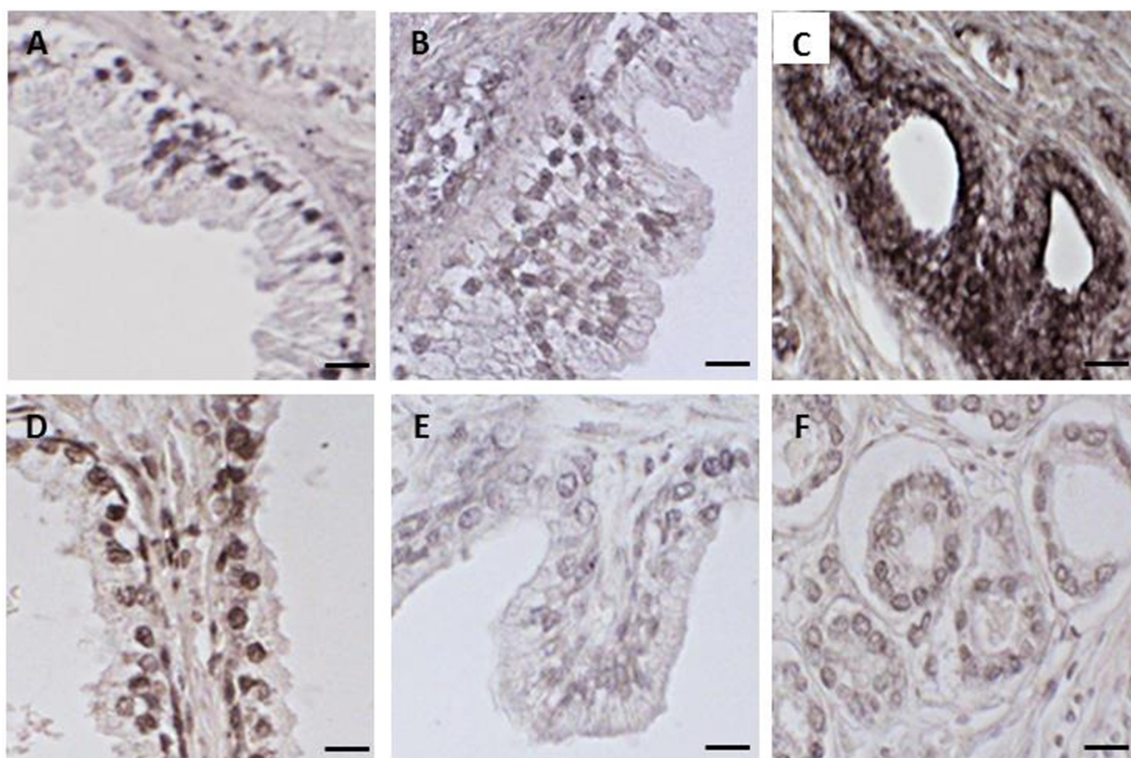


Figura 36. Expresión en Ikk (A-C) y p-Ikk (D-F) en próstata normal (D), HBP (A), PIN (B, E) y cáncer (C, F). Barra; 20 µm.

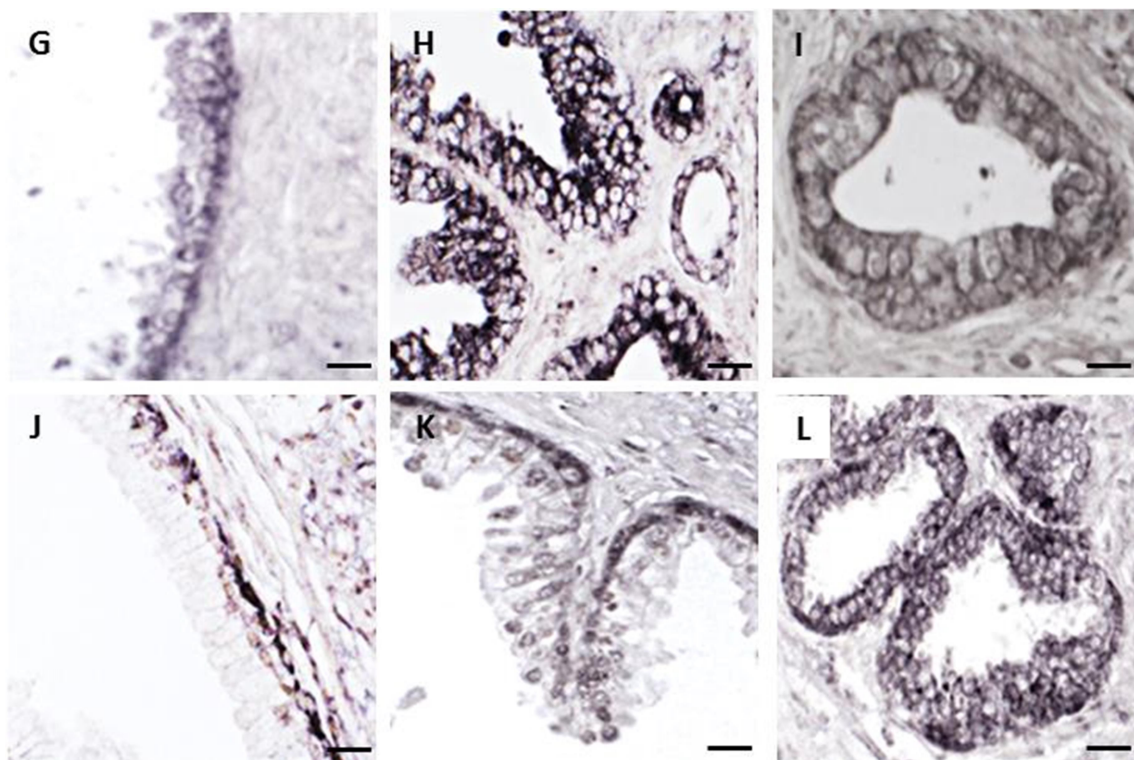


Figura 37. Expresión de IκB (G-I), y p-IκB (J-L) en próstata normal (G, J), PIN (H, K) y cáncer (I, L). Barra; 20 μm.

3.2.4 Activación mTOR

mTOR:

En todos los grupos de pacientes el marcaje para mTOR se observó en células glandulares y con una localización perinuclear. En PN, HBP (Figura 38A), PIN (Figura 38B) y cáncer (Figura 38C) la densidad óptica fue similar en el epitelio (Tabla 41).

p-mTOR:

En HBP (Figura 38D) y PIN (Figura 38E) el 100% de las muestras fueron positivas para p-mTOR (Tabla 41). En próstata normal el marcaje fue homogéneo en las células glandulares. En cáncer se observaron algunos puntos muy oscuros en el citoplasma epitelial y coloración fue en la zona perinuclear. La mayor densidad óptica se observó en el epitelio del grupo de cáncer (Figura 38F).

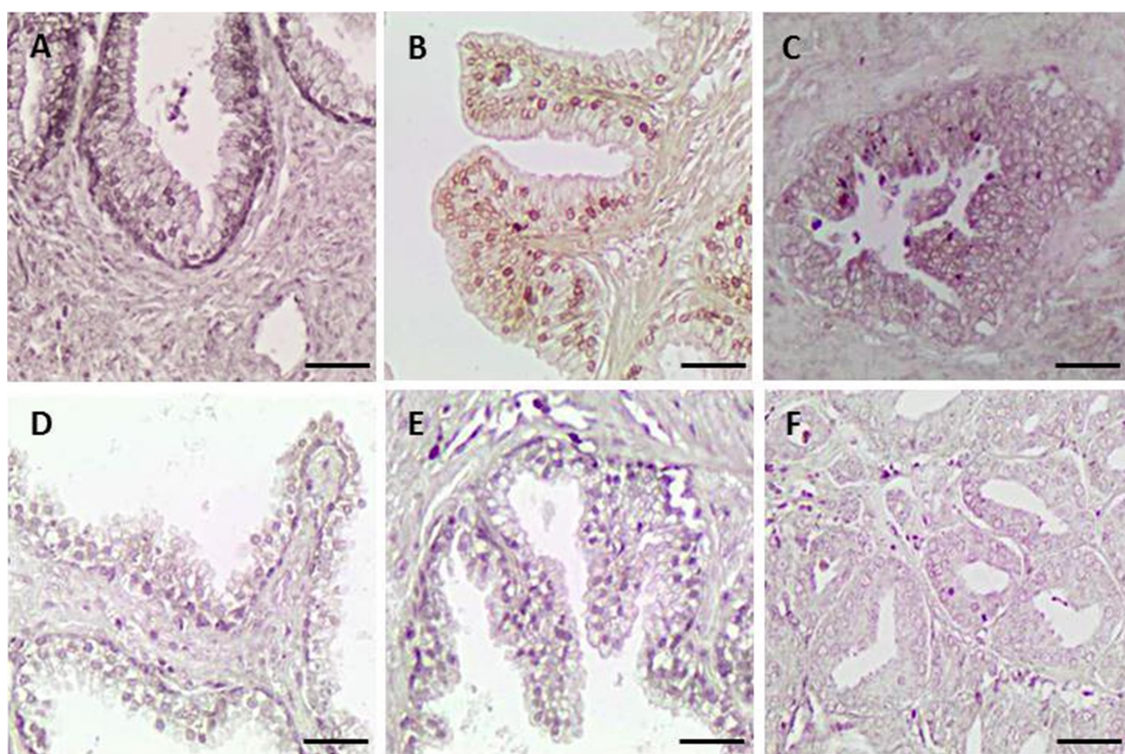


Figura 38. Expresión de mTOR (A-C) y p-mTOR (D-F) en HBP (A, D), PIN (B, E) y cáncer (C, F). Barra 20 μ m.

	mTOR			p-mTOR		
	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.	% (n) de Casos positivos	Epitelio D.O.	Estroma D.O.
PN	85.0 (17)	20.5 \pm 3.4	11.03 \pm 0.8	100 (20)	19.6 \pm 1.2 ^a	11.9 \pm 2.2
HBP	100 (35)	24.0 \pm 5.8	18.0 \pm 1.8	86.7 (13)	21.7 \pm 2.0 ^a	12.8 \pm 1.3
PIN	100 (15)	17.42 \pm 2.0	15.4 \pm 5.8	100 (15)	26.6 \pm 1.5 ^b	14.7 \pm 4.1
Cáncer	96.5 (83)	24.5 \pm 5.8	12.4 \pm 1.5	96.5 (83)	28.0 \pm 1.1 ^b	16.1 \pm 2.0

Tabla 41. Porcentaje de muestras positivas y densidades ópticas de mTOR y p-mTOR en próstata normal (PN), hiperplasia benigna de próstata (HBP), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. D.O.: densidades ópticas (media \pm desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

3.2.5 Activación p21 y p27

p21:

En PN no se observó señal para p21. En HBP (Figura 39A) y PIN (Figura 39B) el 100% de las muestras fueron positivas (Tabla 42) observándose marcaje de los núcleos de muchas células epiteliales y algunas estromales. En cáncer, 84.9% de los pacientes expresaron un marcaje similar pero con un aumento significativo en la densidad óptica.

p27:

En PN (Figura 39D) y biopsias no se encontró señal para p27. En el resto de los grupos se encontró una señal muy tenue en el citoplasma perinuclear tanto en células epiteliales como estrómaticas. La densidad óptica aumentó levemente en PIN (Figura 39E) y cáncer (Figura 39F) respecto a HBP, tanto en el epitelio como en el estroma.

	p21			p27		
	% (n) de Casos positivos	Citoplasma D.O.	Núcleo D.O.	% (n) de Casos positivos	Citoplasma D.O.	Núcleo D.O.
PN	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HBP	100 (35)	66.83±5.4 ^a	4.78±2.94*	77.0 (27)	6.30±1.5	5.4±0.6
PIN	100 (15)	77.30±1.3 ^b	11.0±1.9	66.7 (10)	9.4±1.3	6.4±0.6
Cáncer	84.9 (73)	84.82±6.41 ^c	13.32±1.52*	57.0 (49)	10.16±1.7	7.9±1.0

Tabla 42. Inmunotinción y densidades ópticas de p21 y p27 en próstata normal (PN), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer de próstata. Densidades ópticas (media ± desviación típica) de la inmunotinción en cada grupo de pacientes.

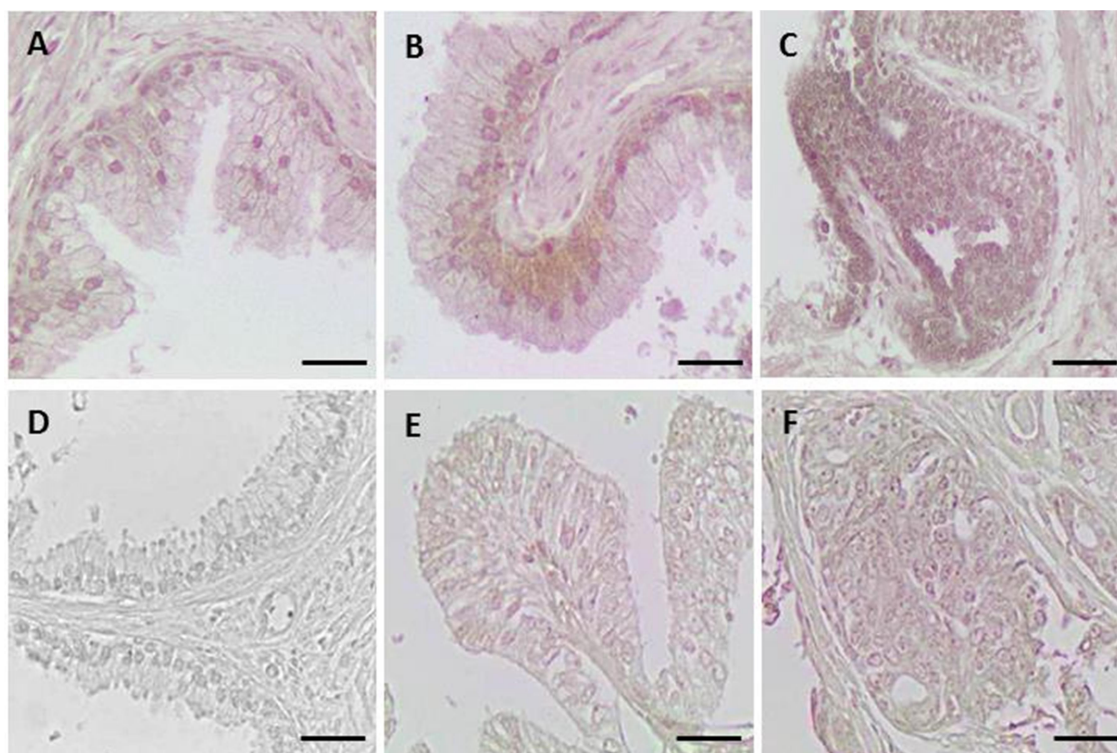


Figura 39. Expresión de p21 (A-C) y p27 (D-F) en próstata normal (D), HBP (A), PIN (B, E) y cáncer (C, F). Barra: 20 μm (C, D, E, F), 25 μm (A, B).

3.3 Proporción de pacientes con inmunotinción positiva para la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt en el estroma y tumor en la cohorte estudiada

Se determinó el porcentaje de pacientes positivos en estroma y tumor, mediante inmunohistoquímica, para cada uno de los factores estudiados. Se asignaron valores relativos a la intensidad de tinción positivos bajos y positivos altos (Tabla 43).

	Estroma			Tumor		
	Expresión	Intensidad		Expresión	Intensidad	
	Positivo % (n)	P bajo % (n)	P alto % (n)	Positivo % (n)	P bajo % (n)	P alto % (n)
TGF-B	51.2(44)	29.1(25)	22.1(19)	47.1(40)	29.4(25)	17.6(15)
TGFBRI	31.4(27)	29.1(25)	2.3(2)	63.5(54)	35.3(30)	28.2(24)
TGFBRII	38.4(33)	32.6(28)	5.8(5)	84.7(73)	25.6(22)	59.3(51)
PI3K	90.7(78)	30.2(26)	60.5(52)	95.3(82)	12.7(11)	82.6(71)
p-Akt-Ser	83.7(72)	26.3(23)	57.0(49)	90.7(78)	14.0(12)	76.7(66)
p-Akt-Thr	79.1(68)	18.6(16)	60.5(52)	79.1(68)	3.5(3)	75.6(65)
Bad	52.3(45)	27.9(24)	24.4(21)	57.0(49)	11.6(10)	45.3(39)
Bim	79.1(68)	59.3(51)	19.8(17)	87.2(75)	50.0(43)	37.2(32)
Mcl-1	77.9(67)	46.5(40)	31.4(27)	84.9(73)	15.1(13)	69.8(60)
Ikk	70.9(64)	24.7(21)	50.0(43)	73.3(63)	15.1(13)	58.1(50)
p-Ikk	77.9(67)	16.3(14)	61.6(53)	80.2(69)	10.5(9)	69.8(60)
IkB	26.7(23)	8.1(7)	18.6(16)	52.3(45)	8.1(7)	44.2(38)
p-IkB	72.1(62)	32.6(28)	39.5(34)	77.9(67)	4.7(4)	73.3(63)
mTOR	96.5 (83)	37.2 (32)	59.3 (51)	96.5 (83)	25.6(22)	70.9(61)
p-mTOR	100 (86)	19.8 (17)	80.2 (69)	100 (86)	19.8(17)	80.2(69)
p21	79.1(68)	53.3(46)	25.6(22)	83.7(72)	27.9(24)	55.8(48)
p27	20.9(18)	20.9(18)	0.0(0)	55.8(48)	51.2(44)	4.7(4)

Tabla 43. Distribución de la frecuencia de pacientes con inmunotinción positiva para la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt según resultados de la técnica de inmunohistoquímica. Se detallan los pacientes positivos y dentro de estos, aquellos con positivo bajo y positivo alto en cuanto a la intensidad del marcaje en células del estroma y tumor.

3.4 Correlación entre la expresión en el estroma y tumor de los componentes de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt con las características clínico-patológicas en cáncer de próstata

Para correlacionar los componentes de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt con los marcadores clásicos establecidos se realizó el test de Spearman, determinando el grado de relación entre las variables.

3.4.1 Correlación entre la expresión de la inmunohistoquímica en el estroma y los marcadores clásicos.

En el análisis de correlación de los componentes de la ruta de transducción TGF-B como p-Akt-Ser, Bad, Mcl-1, Ikk, p-Ikk, IkB, p-IkB y p27 no se observó ninguna asociación significativa con los marcadores clásicos establecidos (Tabla 44). La expresión en el estroma fue inversa y significativa entre TGF-B y PI3K con la progresión bioquímica; entre TGFBRII, PI3K y p21 con la supervivencia; entre mTOR y p-mTOR con el estadio T clínico; entre p-mTOR con la implicación de ganglios y el estadio T patológico; entre Bim

con el PSA preoperatorio; y entre p-Akt-Thr con la invasión perineural. La expresión en el estroma de TGFBR1 se relacionó de forma directa con la progresión bioquímica.

	PSA sérico preoperatorio		Estadio T patológico		Estadio T clínico		Puntuación Gleason	
	r	p	r	p	r	p	r	p
TGF-B	-0.104	0.342	-0.072	0.510	0.002	0.984	-0.020	0.855
TGFBR1	-0.118	0.278	-0.002	0.987	0.139	0.203	-0.047	0.669
TGFBR2	-0.055	0.615	0.008	0.945	0.050	0.649	-0.051	0.641
PI3K	0.010	0.929	0.043	0.697	0.050	0.644	0.042	0.703
p-Akt-Ser	-0.003	0.978	-0.146	0.181	-0.041	0.706	-0.046	0.672
p-Akt-Thr	-0.029	0.790	0.089	0.429	0.009	0.932	0.011	0.923
Bad	0.059	0.588	-0.042	0.699	0.074	0.495	0.132	0.226
Bim	-0.208	0.055	-0.012	0.909	0.124	0.255	-0.065	0.553
Mcl-1	0.108	0.323	0.049	0.655	-0.022	0.813	0.051	0.643
Ikk	-0.052	0.637	-0.110	0.315	-0.001	0.991	-0.082	0.455
p-Ikk	0.067	0.539	-0.084	0.441	0.035	0.751	-0.125	0.253
IkB	0.125	0.250	0.003	0.981	-0.023	0.836	0.068	0.531
p-IkB	-0.089	0.414	-0.088	0.421	-0.058	0.595	0.149	0.170
m-TOR	-0.011	0.922	0.011	0.922	-0.209	0.054	0.087	0.424
p-m-TOR	-0.143	0.190	-0.290	0.007	-0.209	0.054	-0.080	0.466
p21	0.030	0.781	0.008	0.940	-0.163	0.134	-0.065	0.553
p27	-0.030	0.781	0.107	0.329	-0.009	0.932	-0.086	0.432

	Invasión perineural		Implicación de ganglios		Márgenes quirúrgicos positivos		Progresión bioquímica		Supervivencia	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
TGF-B	-0.040	0.712	0.105	0.334	0.101	0.354	-0.238	0.027	-0.198	0.068
TGFBR1	-0.013	0.909	-0.030	0.781	0.033	0.763	0.312	0.003	0.044	0.687
TGFBR2	0.009	0.931	0.053	0.629	0.115	0.292	0.044	0.687	-0.261	0.015
PI3K	0.013	0.908	0.071	0.518	-0.159	0.144	-0.280	0.009	-0.349	0.001
p-Akt-Ser	0.053	0.628	0.097	0.372	-0.041	0.710	-0.152	0.163	0.053	0.628
p-Akt-Thr	-0.270	0.012	0.114	0.298	-0.064	0.557	-0.056	0.607	-0.077	0.483
Bad	-0.002	0.987	-0.010	0.925	-0.061	0.579	-0.058	0.597	-0.054	0.619
Bim	-0.012	0.913	-0.022	0.840	-0.064	0.557	-0.056	0.607	-0.141	0.195
Mcl-1	-0.091	0.595	0.118	0.281	0.132	0.226	0.024	0.825	-0.121	0.265
Ikk	0.113	0.298	0.129	0.235	0.189	0.082	-0.033	0.765	-0.007	0.949
p-Ikk	0.068	0.531	0.118	0.281	0.074	0.496	0.083	0.445	0.005	0.962
IkB	-0.128	0.241	0.116	0.287	-0.045	0.683	0.180	0.097	0.169	0.120
p-IkB	-0.034	0.756	0.137	0.207	-0.149	0.172	0.060	0.584	-0.093	0.396
m-TOR	0.115	0.292	0.042	0.701	0.020	0.857	0.136	0.213	0.115	0.292
p-m-TOR	0.115	0.292	-0.259	0.016	-0.111	0.311	0.002	0.989	-0.028	0.796
p21	0.053	0.631	-0.022	0.840	-0.123	0.259	-0.177	0.103	-0.335	0.002
p27	0.012	0.913	-0.114	0.298	-0.112	0.304	-0.186	0.087	-0.117	0.283

Tabla 44. Correlación entre la expresión en el estroma de los componentes de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt y las características clínico patológicas de cáncer de próstata (prueba de Spearman). Los valores en negrita resalta la significancia estadística (p<0.05).

3.4.2 Correlación entre la expresión de la inmunohistoquímica en el tumor y los marcadores clásicos.

En el análisis de correlación de la expresión tumoral entre los componentes de la ruta de transducción TGF-B con los marcadores clásicos, se observó que TGFBR1, TGFBR2, p-Akt-Ser, Bad, Bim, Mcl-1, Ikk, p-Ikk, IkB, y p-IkB no mostraron ninguna relación de significancia con los marcadores clásicos del cáncer de próstata (Tabla 45). La correlación de la expresión en el tumor presento una relación inversa entre TGF-B, PI3K y p21 con la supervivencia; entre PI3K con márgenes quirúrgicos y progresión bioquímica; entre p-Akt-Thr con la invasión perineural; entre mTOR y p-mTOR con el estadio T clínico; y entre p-m-TOR con el estadio T patológico. La correlación de la expresión de p27 fue directa con el estadio T clínico.

	PSA sérico preoperatorio		Estadio T patológico		Estadio T clínico		Puntuación Gleason	
	r	p	r	p	r	p	r	p
TGF-B	0.117	0.282	-0.005	0.967	0.181	0.096	-0.001	0.990
TGFBRI	-0.066	0.547	0.066	0.551	0.109	0.320	0.030	0.784
TGFBRII	0.021	0.846	0.111	0.310	0.058	0.593	0.023	0.834
PI3K	0.064	0.557	-0.102	0.352	-0.132	0.227	-0.044	0.688
p-Akt-Ser	0.093	0.394	-0.118	0.279	-0.030	0.784	-0.064	0.560
p-Akt-Thr	-0.029	0.790	0.086	0.429	0.009	0.932	0.011	0.932
Bad	-0.065	0.550	-0.064	0.560	-0.010	0.924	0.028	0.798
Bim	0.003	0.982	0.113	0.301	0.069	0.527	-0.007	0.946
Mcl-1	-0.046	0.672	0.111	0.310	-0.007	0.950	-0.063	0.567
Ikk	-0.016	0.884	-0.142	0.193	0.075	0.490	0.001	0.994
p-Ikk	0.053	0.628	-0.130	0.233	0.042	0.704	-0.157	0.150
IkB	0.108	0.324	0.034	0.753	0.028	0.800	0.132	0.226
p-IkB	-0.108	0.323	-0.084	0.441	-0.022	0.843	0.097	0.374
m-Thor	-0.011	0.922	0.011	0.922	-0.209	0.054	0.087	0.424
p-m-Thor	-0.083	0.447	-0.255	0.018	-0.273	0.011	-0.017	0.878
p21	-0.003	0.978	0.044	0.686	-0.104	0.338	-0.046	0.672
p27	-0.083	0.449	0.129	0.238	0.246	0.022	-0.146	0.179

	Invasión perineural		Implicación de ganglios		Márgenes quirúrgicos positivos		Progresión bioquímica		Supervivencia	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
TGF-B	-0.089	0.413	0.126	0.247	-0.065	0.554	-0.024	0.826	-0.247	0.022
TGFBRI	-0.034	0.760	-0.062	0.570	-0.048	0.660	0.184	0.091	-0.089	0.420
TGFBRII	-0.038	0.726	-0.061	0.577	0.066	0.546	0.026	0.810	-0.038	0.726
PI3K	-0.116	0.287	0.049	0.656	-0.280	0.009	-0.310	0.004	-0.366	0.001
p-Akt-Ser	-0.078	0.476	0.071	0.518	0.088	0.420	-0.110	0.312	-0.078	0.476
p-Akt-Thr	-0.270	0.012	0.114	0.298	-0.005	0.960	-0.056	0.607	-0.077	0.483
Bad	-0.059	0.592	-0.031	0.776	-0.087	0.426	-0.175	0.107	-0.059	0.592
Bim	0.074	0.498	-0.081	0.460	-0.056	0.610	0.052	0.633	-0.083	0.446
Mcl-1	-0.112	0.306	0.093	0.393	0.133	0.223	-0.042	0.699	-0.185	0.088
Ikk	0.068	0.532	0.133	0.221	0.099	0.366	-0.014	0.901	0.068	0.532
p-Ikk	0.036	0.742	0.110	0.315	0.152	0.164	0.107	0.327	0.036	0.742
IkB	-0.160	0.142	0.100	0.358	-0.156	0.150	0.090	0.410	-0.107	0.327
p-IkB	0.005	0.962	0.118	0.281	-0.041	0.709	0.024	0.825	-0.058	0.595
m-Thor	0.115	0.292	0.042	0.701	0.020	0.857	0.136	0.213	0.115	0.292
p-m-Thor	0.074	0.496	-0.181	0.095	-0.110	0.311	-0.033	0.763	-0.074	0.496
p21	-0.018	0.868	-0.052	0.633	-0.041	0.710	-0.085	0.435	-0.232	0.032
p27	0.114	0.294	0.085	0.435	0.028	0.798	0.040	0.712	-0.097	0.373

Tabla 45. Correlación entre la expresión en el tumor de los componentes de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt y las características clínico patológicas de cáncer de próstata (prueba de Spearman). Los valores en negrita resalta la significancia estadística (p<0.05).

3.4.3 Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el estroma y los marcadores clásicos.

La correlación entre los marcadores clásicos y la intensidad de la inmunohistoquímica en el estroma para p-Akt-Ser, p-Akt-Thr, Bad, Bim, p-Ikk, IkB, mTOR, p-mTOR, p21 y p27, no presentó ninguna asociación significativa (Tabla 46). El análisis de la correlación presentó una relación inversa entre TGF-B con la progresión bioquímica; entre TGFBRII con supervivencia; entre PI3K con márgenes quirúrgicos; entre Mcl-1 con PSA; entre Ikk con estadio T patológico. La correlación fue positiva entre TGFBRI con la progresión bioquímica y entre p-IkB con la implicación de ganglios.

	PSA sérico preoperatorio		Estadio T patológico		Estadio T clínico		Puntuación Gleason	
	r	p	r	p	r	p	r	p
TGF-B	-0.126	0.248	-0.087	0.428	-0.012	0.911	0.064	0.556
TGFBRI	-0.120	0.273	0.008	0.940	0.136	0.211	-0.032	0.769
TGFBRII	-0.055	0.617	0.024	0.829	0.078	0.478	-0.041	0.707
PI3K	0.123	0.260	0.049	0.654	-0.055	0.612	0.061	0.575
p-Akt-Ser	0.104	0.340	-0.006	0.953	0.017	0.877	-0.042	0.704
p-Akt-Thr	-0.019	0.862	-0.012	0.915	0.055	0.616	0.048	0.661
Bad	0.032	0.772	-0.066	0.544	0.018	0.871	0.163	0.133
Bim	-0.129	0.238	0.096	0.380	0.127	0.245	0.008	0.944
Mcl-1	-0.208	0.055	-0.009	0.933	0.116	0.286	-0.059	0.592
Ikk	-0.083	0.445	-0.237	0.028	0.038	0.729	-0.055	0.614
p-Ikk	0.025	0.817	-0.079	0.470	-0.027	0.808	-0.147	0.178
IkB	0.127	0.246	-0.004	0.972	-0.036	0.743	0.059	0.590
p-IkB	-0.069	0.531	-0.093	0.397	-0.042	0.700	0.200	0.065
m-TOR	0.064	0.561	0.060	0.582	-0.037	0.734	0.019	0.859
p-m-TOR	-0.069	0.530	-0.034	0.757	-0.134	0.217	-0.003	0.980
p21	0.015	0.890	0.103	0.347	-0.023	0.835	-0.030	0.784
p27	-0.030	0.781	0.107	0.329	-0.009	0.932	-0.086	0.432

	Invasión perineural		Implicación de ganglios		Márgenes quirúrgicos positivos		Progresión bioquímica		Supervivencia	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
TGF-B	-0.006	0.954	0.083	0.446	0.090	0.407	-0.208	0.055	-0.198	0.068
TGFBRI	-0.004	0.971	-0.033	0.763	0.052	0.635	0.326	0.002	0.069	0.529
TGFBRII	0.002	0.986	0.082	0.453	0.108	0.322	0.028	0.799	-0.269	0.012
PI3K	0.007	0.947	0.074	0.496	-0.208	0.055	-0.133	0.223	0.020	0.858
p-Akt-Ser	0.098	0.372	0.185	0.088	-0.005	0.964	-0.028	0.799	0.012	0.913
p-Akt-Thr	-0.165	0.130	0.087	0.428	-0.056	0.607	-0.039	0.725	-0.103	0.346
Bad	0.060	0.583	-0.006	0.956	-0.115	0.294	-0.019	0.864	-0.054	0.619
Bim	0.011	0.921	-0.082	0.452	-0.061	0.579	-0.064	0.557	-0.113	0.300
Mcl-1	0.037	0.734	0.122	0.261	0.093	0.397	0.117	0.285	-0.188	0.083
Ikk	-0.021	0.846	0.131	0.230	0.049	0.652	-0.169	0.120	-0.021	0.846
p-Ikk	-0.026	0.810	0.169	0.119	0.048	0.658	0.031	0.774	0.035	0.746
IkB	-0.123	0.259	0.135	0.215	-0.052	0.633	0.139	0.200	0.116	0.287
p-IkB	0.015	0.894	0.246	0.022	-0.076	0.487	0.146	0.181	-0.015	0.894
m-TOR	-0.066	0.543	0.074	0.500	-0.024	0.830	0.011	0.920	0.036	0.744
p-m-TOR	0.036	0.742	-0.029	0.791	-0.029	0.794	-0.078	0.474	-0.030	0.785
p21	0.035	0.749	0.069	0.530	-0.087	0.425	-0.155	0.153	-0.189	0.081
p27	0.012	0.913	-0.114	0.298	-0.112	0.304	-0.186	0.087	-0.117	0.283

Tabla 46. Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el estroma de los componentes de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt y las características clínico patológicas de cáncer de próstata (prueba de Spearman). Los valores en negrita resalta la significancia estadística (p<0.05).

3.4.4 Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el tumor y los marcadores clásicos.

La intensidad de inmunotinción en el tumor para TGF-B, TGFBRII, p-Akt-Ser, Bad, Bim, Mcl-1, Ikk, p-Ikk, IkB, p-IkB, mTOR, p-mTOR y p21 no presentó ninguna asociación significativa con los marcadores clásicos del cáncer de próstata (Tabla 47). La intensidad en el tumor presento una relación directa entre TGFBRI y p27 con el estadio T clínico; y TGFBRI con la progresión bioquímica. La expresión en el tumor fue inversa entre p-Akt-Thr con la invasión perineural; y entre PI3K con los márgenes quirúrgicos, progresión bioquímica y supervivencia.

	PSA sérico preoperatorio		Estadio T patológico		Estadio T clínico		Puntuación Gleason	
	r	p	r	p	r	p	r	p
TGF-B	0.145	0.184	0.008	0.938	0.147	0.178	-0.043	0.694
TGFBRI	-0.078	0.479	0.098	0.537	0.207	0.057	0.083	0.451
TGFBRII	-0.100	0.360	0.068	0.533	0.090	0.410	0.063	0.563
PI3K	-0.140	0.199	0.052	0.633	0.093	0.396	0.043	0.694
p-Akt-Ser	0.107	0.326	-0.075	0.492	-0.101	0.356	-0.109	0.319
p-Akt-Thr	-0.032	0.770	-0.013	0.905	-0.018	0.868	0.040	0.717
Bad	-0.006	0.957	-0.102	0.349	-0.023	0.835	0.054	0.619
Bim	0.023	0.836	0.154	0.157	0.047	0.669	-0.084	0.443
Mcl-1	-0.159	0.143	-0.085	0.437	0.032	0.770	-0.040	0.711
Ikk	-0.005	0.964	-0.197	0.069	0.072	0.511	0.013	0.909
p-Ikk	-0.002	0.987	-0.153	0.160	-0.038	0.729	-0.170	0.117
IKB	0.124	0.255	0.048	0.659	0.033	0.763	0.083	0.450
p-IKB	-0.082	0.456	-0.064	0.560	-0.029	0.794	0.132	0.226
m-TOR	0.152	0.163	0.052	0.632	0.091	0.405	-0.030	0.776
p-m-TOR	-0.069	0.530	-0.034	0.757	-0.134	0.217	-0.003	0.980
p21	0.089	0.413	0.104	0.342	0.014	0.901	0.017	0.880
p27	-0.118	0.278	0.134	0.220	0.259	0.016	-0.126	0.248

	Invasión perineural		Implicación de ganglios		Márgenes quirúrgicos positivos		Progresión bioquímica		Supervivencia	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
TGF-B	-0.118	0.281	0.164	0.132	-0.067	0.539	0.002	0.988	-0.172	0.113
TGFBRI	-0.006	0.958	0.017	0.878	-0.068	0.536	0.286	0.008	-0.072	0.514
TGFBRII	-0.039	0.720	-0.052	0.635	-0.044	0.688	-0.001	0.996	-0.083	0.447
PI3K	-0.010	0.924	0.101	0.354	-0.221	0.041	-0.211	0.051	-0.363	0.001
p-Akt-Ser	0.007	0.948	0.003	0.978	-0.054	0.625	-0.083	0.446	-0.049	0.656
p-Akt-Thr	-0.321	0.003	0.125	0.252	0.001	0.991	-0.054	0.619	-0.084	0.441
Bad	-0.014	0.898	-0.005	0.964	-0.096	0.380	-0.121	0.267	-0.100	0.362
Bim	0.049	0.654	-0.169	0.119	-0.113	0.299	0.071	0.519	-0.014	0.898
Mcl-1	-0.028	0.797	0.043	0.697	0.030	0.785	0.069	0.526	-0.045	0.680
Ikk	0.011	0.922	0.181	0.095	0.064	0.560	0.035	0.747	0.048	0.657
p-Ikk	0.007	0.947	0.143	0.188	0.121	0.269	0.102	0.348	0.098	0.371
IKB	-0.143	0.188	0.123	0.260	-0.147	0.178	0.078	0.476	-0.115	0.292
p-IKB	0.054	0.621	0.133	0.224	-0.059	0.588	0.081	0.456	-0.008	0.945
m-TOR	-0.004	0.971	0.024	0.827	-0.119	0.274	0.194	0.073	-0.004	0.971
p-m-TOR	0.036	0.742	-0.029	0.791	-0.029	0.794	-0.078	0.474	-0.030	0.785
p21	0.086	0.429	-0.037	0.733	-0.029	0.760	-0.154	0.157	-0.066	0.544
p27	0.133	0.222	0.068	0.534	0.038	0.727	0.028	0.798	-0.092	0.398

Tabla 47. Correlación entre la intensidad de la inmunohistoquímica en el estroma de los componentes de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt y las características clínico patológicas de cáncer de próstata (prueba de Spearman). Los valores en negrita resalta la significancia estadística (p<0.05).

3.5 Correlación de la expresión de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt con el tiempo de recurrencia bioquímica (análisis de supervivencia)

En el análisis de Kaplan-Meier y el test del *log-rank* (Figura 40) para la expresión de TGF-B en el estroma, los pacientes negativos tienen tiempos de supervivencia dos veces más cortos que los positivos. Para la expresión de TGFBR1 los pacientes positivos tienen tiempos cinco veces más cortos que los negativos. La expresión en el estroma y tumor de PI3K tuvieron tiempos de progresión bioquímica significativamente más cortos los pacientes negativos que los positivos.

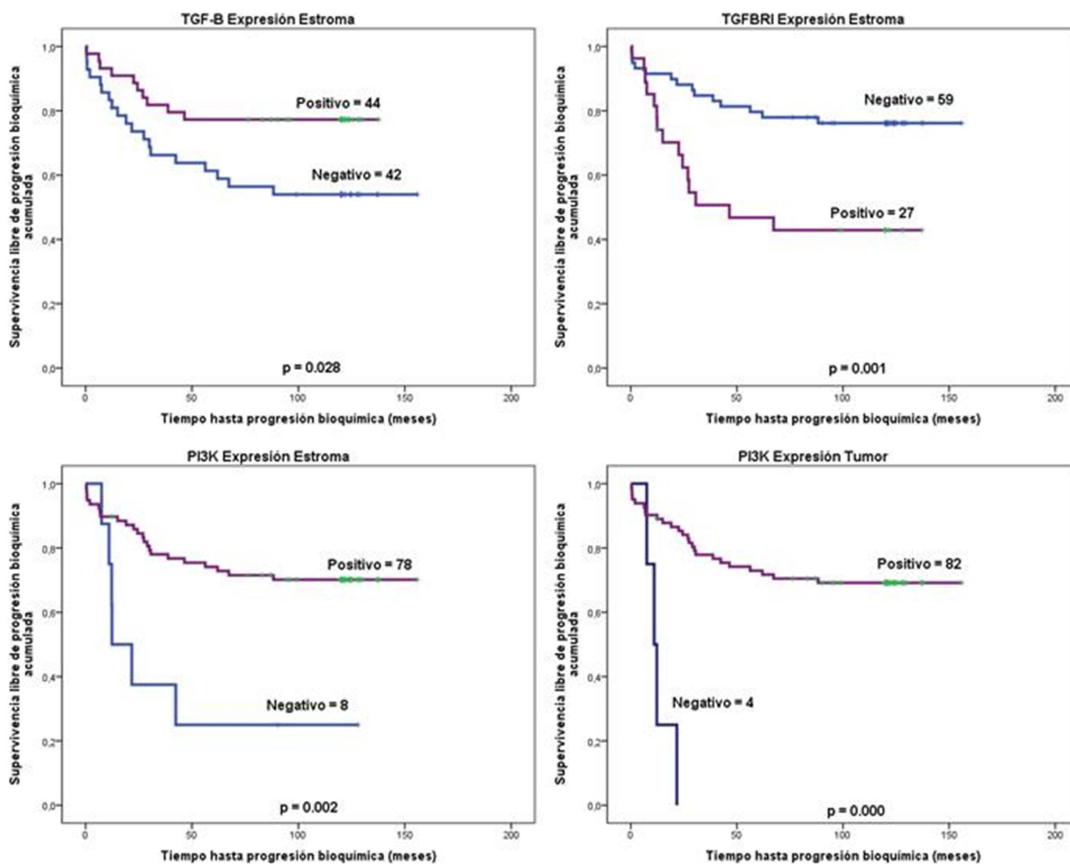


Figura 40. Análisis de Kaplan-Meier de la expresión de los componentes de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt con resultados significantes. Las barras verticales se corresponden con observaciones censuradas. El valor de p corresponde a la prueba del *log-rank*.

El análisis de la intensidad de los componentes de la ruta Kaplan-Meier y el test del *log-rank* (Figura 41) mostraron valores de significación para TGFBR1 donde los pacientes positivos altos presentaron tiempos de recurrencia bioquímica significativamente más cortos que los positivos bajos en el estroma, en PI3K no hay diferencia entre los pacientes

positivos bajos con respecto a los positivos altos. En el tumor los pacientes positivos altos para TGFBR1 tuvieron tiempos cinco veces más cortos que los positivos bajos.

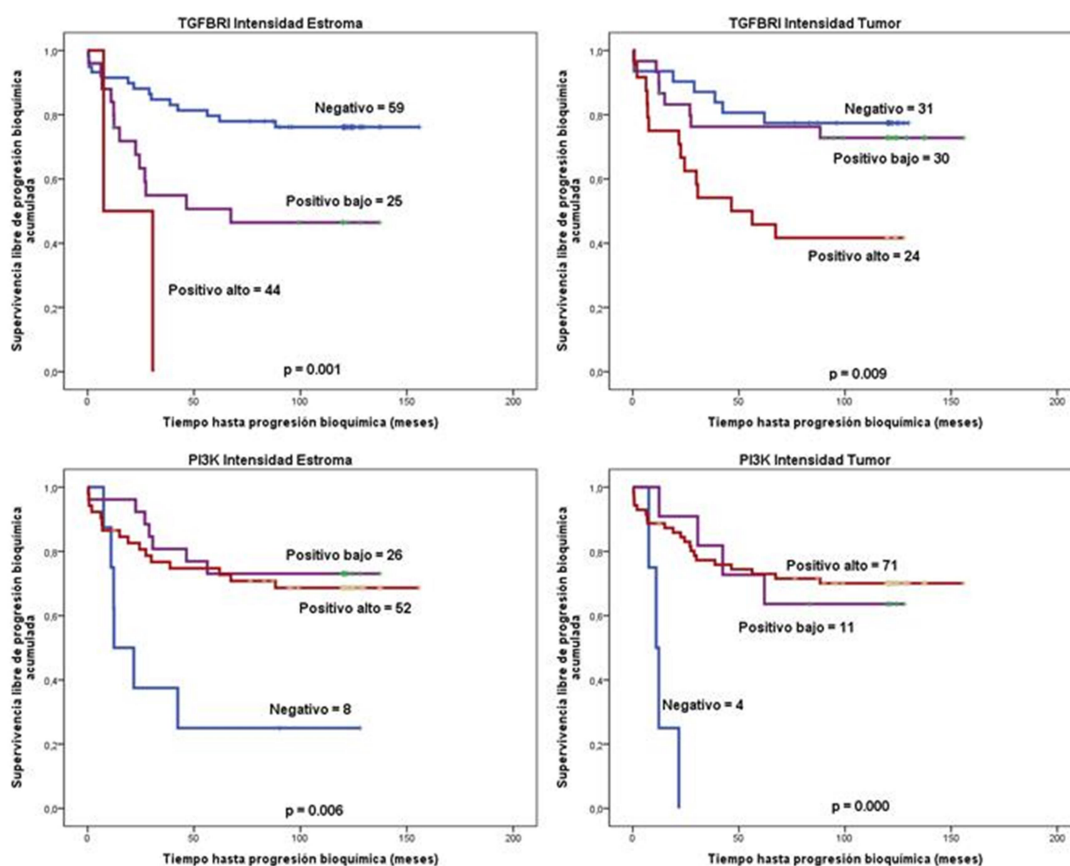


Figura 41. Análisis de Kaplan-Meier de la inmunotinción de los componentes de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt con resultados significantes. Las barras verticales se corresponden con observaciones censuradas. El valor de p corresponde a la prueba del *log-rank*.

El modelo de la regresión de riesgos proporcionales de Cox unifactorial (Tabla 48) confirmó los resultados obtenidos para TGF-B, TGFBR1 y PI3K en la expresión del estroma. En cambio en el tumor solo se confirmó el resultado para PI3K.

Estroma	p	RR (IC 95%)	Tumor	p	RR (IC 95%)
TGF-B	0.033	0.434 (0.202-0.934)	TGF-B	0.825	0.921 (0.443-1.914)
TGFBR1	0.002	3.114 (1.496-6.483)	TGFBR1	0.092	2.080 (0.888-4.873)
TGFBR2	0.794	1.104 (0.527-2.312)	TGFBR2	0.698	1.232 (0.429-3.542)
PI3K	0.003	0.256 (0.103-0.638)	PI3K	0.000	0.102 (0.31-0.328)
p-Akt-Ser	0.162	0.544 (0.232-1.276)	p-Akt-Ser	0.275	0.555 (0.193-1.598)
p-Akt-Thr	0.715	0.853 (0.364-1.998)	p-Akt-Thr	0.715	0.853 (0.364-1.998)
Bad	0.657	0.848 (0.409-1.757)	Bad	0.115	0.555 (0.267-1.154)
Bim	0.669	0.830 (0.355-1.945)	Bim	0.624	1.348 (0.408-4.456)
Mcl-1	0.768	1.145 (0.466-2.812)	Mcl-1	0.787	0.875 (0.334-2.295)
IkK	0.657	0.831 (0.368-1.877)	IkK	0.843	0.921 (0.408-2.079)
p-IkK	0.582	1.311 (0.500-3.436)	p-IkK	0.451	1.501 (0.522-4.314)
IkB	0.064	2.031 (0.959-4.305)	IkB	0.357	1.416 (0.676-2.965)
p-IkB	0.643	1.223 (0.522-2.863)	p-IkB	0.881	1.071 (0.436-2.631)
mTOR	0.452	21.483 (0.007-63729)	mTOR	0.452	21.483 (0.007-63729)
p-mTOR	0.858	0.833 (0.113-60129)	p-mTOR	0.720	0.769 (0.183-3.235)
p21	0.065	0.476 (0.216-1.048)	p21	0.388	0.673 (0.274-1.654)
p27	0.104	0.371 (0.112-1.228)	p27	0.686	1.165 (0.556-2.439)

Tabla 48: Análisis de Cox unifactorial de la expresión en estroma y tumor de marcadores en estudio de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt para el tiempo de recurrencia bioquímica. RR: razón de riesgo; IC: intervalo de confianza.

El modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox unifactorial (Tabla 49) confirmó los resultados obtenidos para la intensidad de TGFBR1 en el estroma y el tumor, así como para PI3K solo en el tumor.

Estroma	p	RR (IC 95%)	Tumor	p	RR (IC 95%)
TGF-B	0.079	0.630 (0.377-1.054)	TGF-B	0.919	1.025 (0.636-1.652)
TGFBR1	0.001	2.844 (1.564-5.172)	TGFBR1	0.008	1.905 (1.185-3.064)
TGFBR2	0.955	0.983 (0.542 - 1.784)	TGFBR2	0.887	1.036 (0.637-1.685)
PI3K	0.088	0.630 (0.370-1.071)	PI3K	0.050	0.423 (0.234-0.767)
p-Akt-Ser	0.572	0.872 (0.541-1.404)	p-Akt-Ser	0.329	0.772 (0.460-1.298)
p-Akt-Thr	0.744	0.930 (0.601-1.438)	p-Akt-Thr	0.705	0.921 (0.602-1.409)
Bad	0.971	1.009 (0.641-1.586)	Bad	0.260	0.767 (0.537-1.183)
Bim	0.585	0.854 (0.484-1.505)	Bim	0.456	1.238 (0.706-2.173)
Mcl-1	0.247	1.360 (0.808-2.290)	Mcl-1	0.676	1.116 (0.668-1.865)
IkK	0.136	0.726 (0.477-1.106)	IkK	0.934	1.018 (0.665-1.558)
p-IkK	0.823	1.053 (0.669-1.656)	p-IkK	0.489	1.193 (0.723-1.968)
IkB	0.327	1.236 (0.809-1.887)	IkB	0.437	1.162 (0.796-1.697)
p-IkB	0.234	1.331 (0.831-2.130)	p-IkB	0.604	1.132 (0.708-1.809)
m-TOR	0.670	1.152 (0.600-2.213)	m-TOR	0.067	2.326 (0.924-5.741)
p-m-TOR	0.488	0.791 (0.407-1.536)	p-m-TOR	0.298	0.738 (0.417-1.307)
p21	0.170	0.636 (0.367-1.103)	p21	0.219	0.751 (0.475-1.186)
p27	0.104	0.371 (0.112-1.228)	p27	0.725	1.123 (0.589-2.140)

Tabla 49: Análisis de Cox unifactorial de la intensidad en estroma y tumor de marcadores en estudio de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt para el tiempo de recurrencia bioquímica. RR: razón de riesgo; IC: intervalo de confianza.

3.6 Significado clínico de la expresión de las rutas de transducción en el estroma y tumor en cáncer de próstata

3.6.1 Análisis de frecuencia de los parámetros clínicos

Los pacientes, con una media de edad de 66.00 (52-74 años), se distribuyeron según los parámetros clínicos establecidos: PSA preoperatorio, puntuación Gleason, márgenes quirúrgicos, invasión perineural, ganglios, estadio patológico, progresión bioquímica y supervivencia (Tabla 50).

		<u>Mediana (rango)</u>	
Edad (años)		66.00 (52 – 74)	
PSA sérico preoperatorio (ng/ml)		11.35 (1,4- 233)	
PSA sérico preoperatorio	% (n)	Puntuación Gleason	% (n)
< 10 ng/ ml	36.0 (31)	≤ 6	82.6 (71)
≥ 10 ng/ ml	64.0 (55)	7	9.3 (8)
		≥ 8	8.1 (7)
Estadio clínico		Estadio patológico	
I	54.7 (47)	II	65.1 (56)
II	45.3 (39)	III	31.4 (27)
		IV	3.5 (3)
Invasión perineural	26.7 (23)	Invasión de ganglios	4.7 (4)
Márgenes quirúrgicos positivos	38.4 (33)	Progresión bioquímica	33.7 (29)
Supervivencia	73.3 (63)		

Tabla 50. Distribución de pacientes según los parámetros clínico-patológicos establecidos.

3.6.2 Valor pronóstico de los marcadores clásicos para recurrencia bioquímica en la cohorte estudiada

El análisis de Kaplan-Meier (Figura 42) y la prueba de Cox unifactorial (Tabla 51) confirmaron el valor pronóstico para la recurrencia bioquímica del estadio T patológico, puntuación Gleason y metástasis en ganglios linfáticos pero no del PSA sérico total preoperatorio, invasión perineural y estatus de márgenes quirúrgicos.

	p	RR (IC al 95%)
PSA sérico preoperatorio	0.146	1.879 (0.802 – 4.401)
Estadio T patológico	0.017	2.017 (1.132 – 3.595)
Puntuación Gleason	0.005	3.128 (1.420 – 6.893)
Invasión perineural	0.077	1.971 (0.930 – 4.177)
Implicación de ganglios	0.001	0.166 (2.068 – 18.381)
Márgenes quirúrgicos	0.404	1.367 (0.657 – 2.844)

Tabla 51. Análisis de regresión de riesgo proporcional de Cox unifactorial de marcadores clásicos para el tiempo de recurrencia bioquímica. Los valores en negritas resaltan la significación estadística. RR: razón de riesgo; IC: intervalo de confianza.

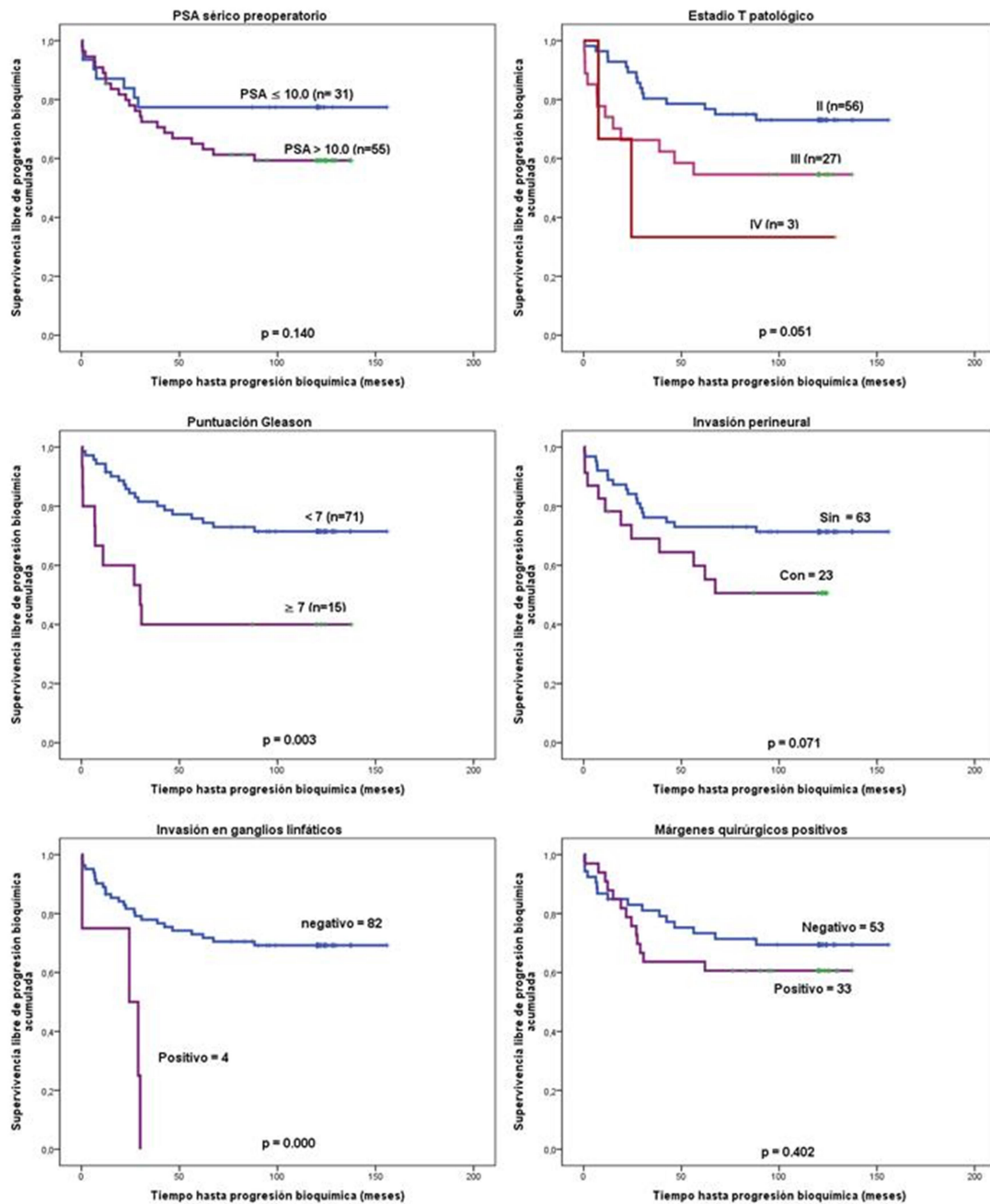


Figura 42. Análisis de Kaplan-Meier de marcadores clásicos para el tiempo de recurrencia bioquímica. Las barras verticales se corresponden con observaciones censuradas. El valor de p corresponde a la prueba del *log-rank*.

3.7 Valor pronóstico para recurrencia bioquímica de los componentes de las rutas de transducción estudiadas en asociación con marcadores clásicos

Después de realizarse el análisis de supervivencia, el análisis de Cox unifactorial y determinar cuáles de nuestros factores en estudio tenían valor pronóstico para recurrencia bioquímica se analizó su utilidad en conjunto con los marcadores clásicos. Se escogieron para ello los marcadores clásicos de importancia en esta cohorte tras corroborarse su valor pronóstico (ver Tabla 51 y Figura 42). Se utilizó para tal fin el análisis de Cox multifactorial limitando el número de factores incluidos para evitar el sobre ajuste (*overfitting*) en los modelos y así permitir la eficacia en la predicción.

Vía de transducción IL-1a/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1

El análisis de Cox unifactorial en la expresión en el estroma y en el tumor para IL-1a, IL-1Ra y p38; así como, intensidad en el tumor de IL1a y p38 en el estroma, resultaron tener por sí solos valor pronóstico para la recurrencia bioquímica.

La expresión de IL-1a en el estroma y en el tumor (Tabla 52A, 52B) se mantuvieron como factor pronóstico independiente para los efectos del estadio T patológico, puntuación Gleason e implicación de ganglios. El valor pronóstico de los tres marcadores clásicos se observó en ambos modelos (Tabla 52A, 52B) indicando que la expresión de IL-1a en el estroma y en el tumor son factores pronósticos complementarios al estadio T patológico, puntuación Gleason e implicación de ganglios.

La expresión de IL-1Ra y p38 en el estroma, e IL-1Ra en el tumor (Tabla 52C-E) se mantuvieron como factores pronósticos independientes tras el ajuste del estadio T patológico y puntuación Gleason. Lo que indica que IL-1Ra y p38 en el estroma e IL-1Ra en el tumor son factores pronósticos complementarios al estadio T patológico y la puntuación Gleason.

La expresión de p38 en el tumor se mantuvo como factor pronóstico independiente tras el ajuste del estadio T patológico e implicación de ganglios. El valor pronóstico de ambos marcadores se observó en este modelo (Tabla 52F) lo que indica que los valores de p38 en el tumor son valores pronósticos complementarios al estadio T patológico e implicación de ganglios.

Al análisis de supervivencia unifactorial en la intensidad en el estroma de p38 y en el tumor para IL-1a, resultaron tener por sí solos valor pronóstico para la recurrencia bioquímica.

La intensidad de p38 (Tabla 53A) en el estroma mantuvo su valor pronóstico con el estadio T patológico. La intensidad de IL-1a en tumor mantuvo su valor pronóstico independiente tras ajustar para los efectos del estadio T patológico, puntuación Gleason e implicación de ganglios. El valor pronóstico de estos tres marcadores se conservó (Tabla 53B) lo que

indica que IL-1a es un factor pronóstico complementario a estadio T patológico, puntuación Gleason e implicación de ganglios.

A	p	RR (IC al 95%)
Estadio T patológico	0.014	2.113 (1.166 – 3.827)
Puntuación Gleason	0.002	3.798 (1.639 – 8.801)
Implicación de ganglios	0.008	4.737 (1.500 – 14.956)
IL-1a expresión estroma	0.003	0.265 (0.109 – 0.644)

B	p	RR (IC al 95%)
Estadio T patológico	0.020	2.026 (1.118 – 3.669)
Puntuación Gleason	0.004	3.447 (1.502 – 7.913)
Implicación de ganglios	0.010	4.533 (1.444 – 14.233)
IL-1a expresión tumor	0.010	0.272 (0.101 – 0.734)

C	p	RR (IC al 95%)
Estadio T patológico	0.006	2.339 (1.270-4.308)
Puntuación Gleason	0.005	3.203 (1.423-7.211)
IL-1Ra expresión estroma	0.055	2.435 (0.981-6.048)

D	p	RR (IC al 95%)
Estadio T patológico	0.011	2.281 (1.204 – 4.322)
Puntuación Gleason	0.007	3.084 (1.368 – 6.953)
IL-1Ra expresión tumor	0.029	4.978 (1.175 – 21.098)

E	p	RR (IC al 95%)
Estadio T patológico	0.006	2.304 (1.267 - 4.188)
Puntuación Gleason	0.008	3.034 (1.343 – 6.855)
p38 expresión estroma	0.037	0.424 (0.190 – 0.9948)

F	p	RR (IC al 95%)
Estadio T patológico	0.027	1.896 (1.074 – 3.345)
Implicación de ganglios	0.005	4.961 (1.630 – 15.097)
p38 expresión tumor	0.013	0.392 (0.187 – 0.821)

Tabla 52. Análisis de Cox multifactorial para el tiempo de recurrencia bioquímica de la expresión en el estroma y tumor de los componentes de vía de transducción IL-1a/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 junto con los marcadores clásicos. Los valores en negrita resaltan la significación estadística. RR: razón de riesgo; IC: intervalo de confianza.

A	p	RR (IC al 95%)
Estadio T patológico	0.011	2.130 (1.186 – 3.827)
p38 Intensidad estroma	0.018	1.806 (1.105 – 2.953)

B	p	RR (IC al 95%)
Estadio T patológico	0.016	2.063 (1.145 – 3.719)
Puntuación Gleason	0.002	3.639 (1.580 – 8.380)
Implicación de ganglios	0.008	4.718 (1.495 – 14.887)
IL-1a Intensidad tumor	0.005	0.499 (0.305 – 0.815)

Tabla 53. Análisis de Cox multifactorial para el tiempo de recurrencia bioquímica de la intensidad en el estroma y tumor de los componentes de la vía de transducción IL-1a/p38NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 junto con los marcadores clásicos. Los valores en negrita resaltan la significación estadística. RR: razón de riesgo; IC: intervalo de confianza.

Vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt

La expresión de TGF-B, TGFBR1, PI3K en el estroma y PI3K en tumor al realizar el análisis unifactorial de Cox mostró que estos factores podían tener por si solos valor pronóstico para la recurrencia bioquímica. Al estudiar su utilidad en conjunto con marcadores clásicos por el modelo de regresión de Cox multifactorial TGF-B (Tabla 54A), TGFBR1 (Tabla 54B) y PI3K (Tabla 54C) en el estroma se mantuvieron como factores pronósticos independientes tras ajustarse para los efectos del estadio T patológico, puntuación Gleason e implicación de ganglios.

PI3K en el tumor (Tabla 54D) resulto ser un marcador pronóstico de recurrencia bioquímica después de ajustar para los efectos de la puntuación Gleason e implicación de ganglios.

A	p	RR (IC al 95%)
Estadio T patológico	0.008	2.176 (1.224 – 3.867)
Puntuación Gleason	0.005	3.456 (1.442 – 8.282)
Implicación de ganglios	0.022	3.796 (1.211 – 11.898)
TGF-B expresión estroma	0.019	0.399 (0.185 – 0.861)

B	p	RR (IC al 95%)
Estadio T patológico	0.045	1.875 (1.015 – 3.464)
Puntuación Gleason	0.001	4.068 (1.751 – 9.449)
Implicación de ganglios	0.042	3.472 (1.047 – 11.519)
TGFBR1 expresión estroma	0.002	3.432 (1.596 – 7.380)

C	p	RR (IC al 95%)
Estadio T patológico	0.010	2.113 (1.200 – 3.719)
Puntuación Gleason	0.003	3.518 (1.542 – 8.028)
Implicación de ganglios	0.007	4.944 (1.562 – 15.644)
PI3K expresión estroma	0.000	0.172 (0.065 – 0.452)

D	p	RR (IC al 95%)
Puntuación Gleason	0.033	2.440 (1.073 – 5.552)
Implicación de ganglios	0.002	6.023 (1.891 – 19.187)
PI3K expresión tumor	0.000	0.087 (0.026 – 0.293)

Tabla 54. Análisis de Cox multifactorial para el tiempo de recurrencia bioquímica de la expresión en el estroma y tumor de los componentes de la vía de transducción TGF-B/PI3K/AKT junto con los marcadores clásicos. Los valores en negrita resaltan la significación estadística. RR: razón de riesgo; IC: intervalo de confianza.

La intensidad de TGFBR1 y PI3K tanto en el estroma como en el tumor se mantuvieron como factores pronósticos independientes cuando se realizó el análisis de Cox unifactorial. La intensidad en el estroma de TGFBR1 (Tabla 55A) en el análisis de Cox multifactorial resultó ser un factor pronóstico complementario al estadio T patológico, puntuación Gleason e implicación de ganglios, sin embargo, el mismo marcador en el tumor es complementario después del ajuste con el estadio T patológico y puntuación Gleason.

La intensidad de PI3K en el estroma y tumor resultó ser un marcador pronóstico de recurrencia bioquímica tras el ajuste con estadio T patológico, puntuación Gleason e implicación de ganglios (Tabla 55C-D).

A	p	RR (IC al 95%)
Estadio T patológico	0.044	1.856 (1.016 – 3.390)
Puntuación Gleason	0.005	3.334 (1.434 – 7.754)
Implicación de ganglios	0.023	3.952 (1.211 – 12.898)
TGFBRI intensidad estroma	0.001	2.559 (1.444 – 4.535)

B	p	RR (IC al 95%)
Estadio T patológico	0.011	2.130 (1.186 – 3.827)
Puntuación Gleason	0.004	3.263 (1.444 – 7.375)
TGFBRI intensidad tumor	0.018	1.806 (1.105 – 2.953)

C	p	RR (IC al 95%)
Estadio T patológico	0.009	2.197 (1.218 – 3.963)
Puntuación Gleason	0.002	3.622 (1.573 – 8.341)
Implicación de ganglios	0.006	5.012 (1.581 – 15.892)
PI3K intensidad estroma	0.022	0.517 (0.293 – 0.911)

D	p	RR (IC al 95%)
Estadio T patológico	0.023	1.953 (1.096 – 3.481)
Puntuación Gleason	0.006	3.223 (1.403 – 7.402)
Implicación de ganglios	0.005	5.525 (1.699 – 17.968)
PI3K intensidad tumor	0.002	0.382 (0.209 – 0.697)

Tabla 55. Análisis de Cox multifactorial para el tiempo de recurrencia bioquímica de la intensidad en el estroma y tumor de los componentes de la vía de transducción TGF-B/PI3K/AKT junto con los marcadores clásicos. Los valores en negrita resaltan la significación estadística. RR: razón de riesgo; IC: intervalo de confianza.

4 Cultivos celulares

A. TGF-B

1. Efecto de TGF-B en el tamaño de la población celular

Primero se determinó el efecto de las concentraciones crecientes de TGF-B en el tamaño de la población celular viable mediante el ensayo del MTT a 24, 48 y 72 h de tratamiento (Figura 43). En las tres líneas se observó un aumento de la proliferación, poco visible a 24 h de tratamiento, que aumentaba a las 48 h y empezaban a estabilizarse y disminuían a 72 h. También se probaron diferentes concentraciones de TGF-B, observando que la proliferación aumentaba con una concentración mayor de 1ng/ml de TGF-B y se estabilizaba entre los 5 y 10 ng/ml.

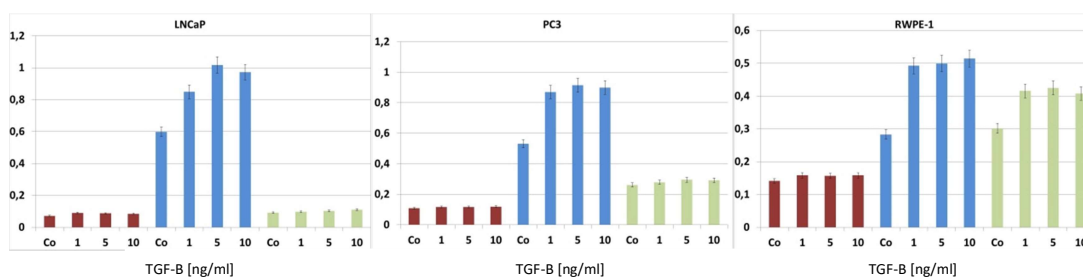


Figura 43. Efectos de TGF-B en el tamaño de la población viables de células LNCaP, PC3 y RWPE-1. Las células fueron tratadas con TGF-B a las concentraciones indicadas a las 24 h (rojo), 48 h (azul) y 72 h (verde). Al final del tratamiento las células fueron incubadas con MTT.

Para homogenizar los experimentos se eligieron como condiciones de trabajo para las tres líneas celulares un tiempo de 48 h y dos concentraciones: 5 ng/ml y 10 ng/ml (Figura 43).

2. Inducción de proliferación de TGF-B

Se determinó la distribución de células según su contenido en DNA con el fin de conocer si el efecto ejercido por TGF-B se debía a la proliferación celular. La distribución celular determinada por incorporación de yoduro de propidio y medida por citometría de flujo en los cultivos de las tres líneas celulares sometidos a TGF-B, mostró un incremento de la posición de la células en la fase S+G2/M paralelo al aumento de concentración de estas citoquinas a la vez que disminuye la fracción G_0/G_1 . En este sentido, se han observado diferencias entre las tres líneas. En LNCaP va aumentando hasta 5 ng/ml y luego comienza a desaparecer.

En PC3 la cúspide se produce con 10 ng/ml. En RWPE-1 se estabiliza entre 1 y 10 ng/ml y el descenso se produce con concentraciones mayores (Figura 44).

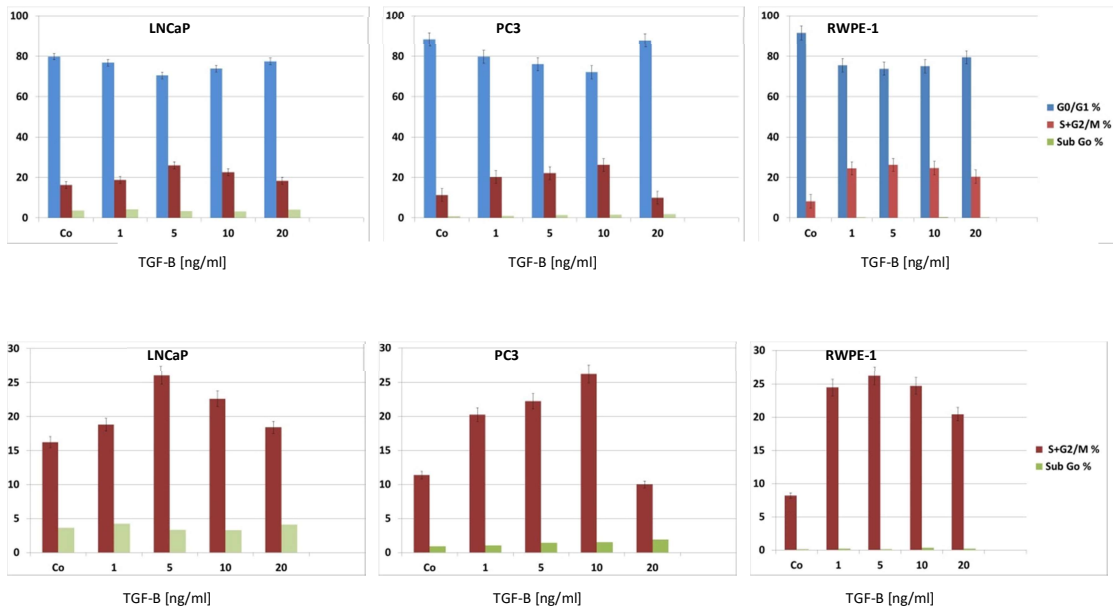


Figura 44. Efecto de TGF-B a diferentes concentraciones sobre las líneas celulares LNCaP, PC3 y RWPE-1. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de TGF-B. Al final del tratamiento se estimó la distribución de las células según su cantidad de DNA por citometría de flujo de las tres líneas celulares.

3. Efecto de la inhibición de p38 en la proliferación por TGF-B

Para estudiar el papel del inhibidor de p38 en la proliferación celular mediada por TGF-B, primero analizamos mediante ensayo del MTT el efecto de dicho inhibidor (SB203508) a una concentración de 10 μ M, en combinación con TGF-B (5 y 10 ng/ml) a 48 h de tratamiento. En condiciones basales, la inhibición de p38 MAPK no tuvo efecto en RWPE-1, mientras que hizo disminuir la proliferación celular en PC-3 y LNCaP (Figura 45).

Cuando se combinó el inhibidor y TGF-B, también disminuyó la proliferación respecto a la situación sin inhibidor.

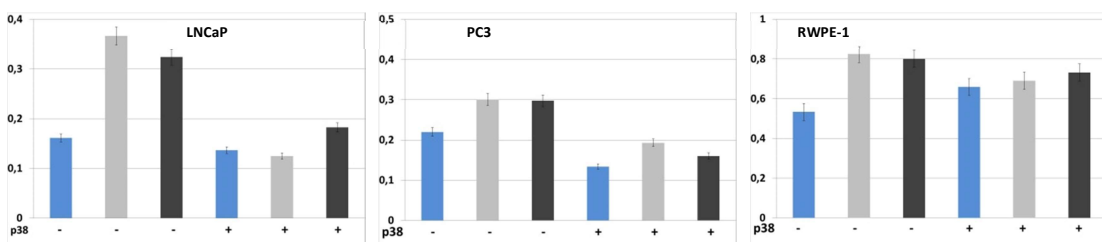


Figura 45. Efecto de la inhibición de p38 en la proliferación mediada por TGF-B. Los gráficos muestran el efecto de TGF-B a 0 ng/ml (azul), 5 ng/ml (gris) y 10 ng/ml (negro) solo o combinado con el inhibidor p38 a una concentración de 10 μ M en el tamaño de la población viable de las células LNCaP, PC3 y RWPE-1 medida a 48 h de la adición de la citoquina mediante al ensayo de MTT. Los inhibidores se aplicaron 4 h antes del tratamiento con TGF-B.

4. Inducción de p38 en la proliferación por TGF-B

Para determinar si el inhibidor de p38 frena la proliferación celular en combinación con TGF-B, las células fueron tratadas como se describe en el apartado anterior y se determinó que tanto en LNCaP como en PC-3, el porcentaje de células S+G2/M aumenta respecto al control en presencia de TGF-B, a la vez que disminuye el porcentaje de células en G₀/G₁ (Figura 46).

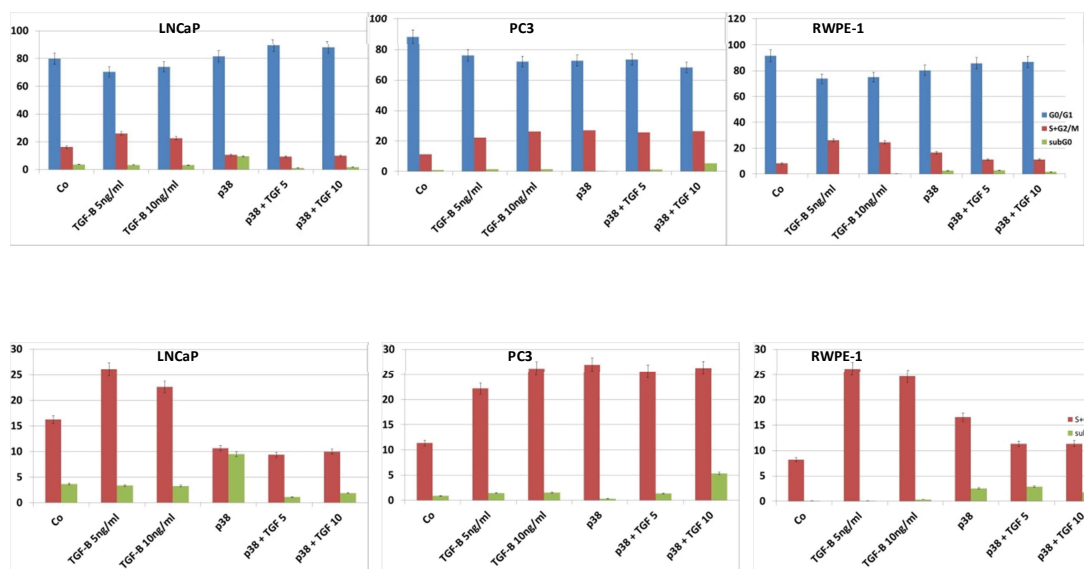


Figura 46. Inhibición de p38 en la proliferación de la fracción celular de LNCaP, PC3 y RWPE-1 mediada por TGF-B.

El inhibidor de p38 por sí mismo no indujo cambios significativos en la fracción sub-G₀/G₁ pero si disminuyó ligeramente el porcentaje de células en S+G₂/M. Cuando se combina el inhibidor y el factor, no se recupera el efecto proliferativo del TGF-B (Figuras 46 y 47).

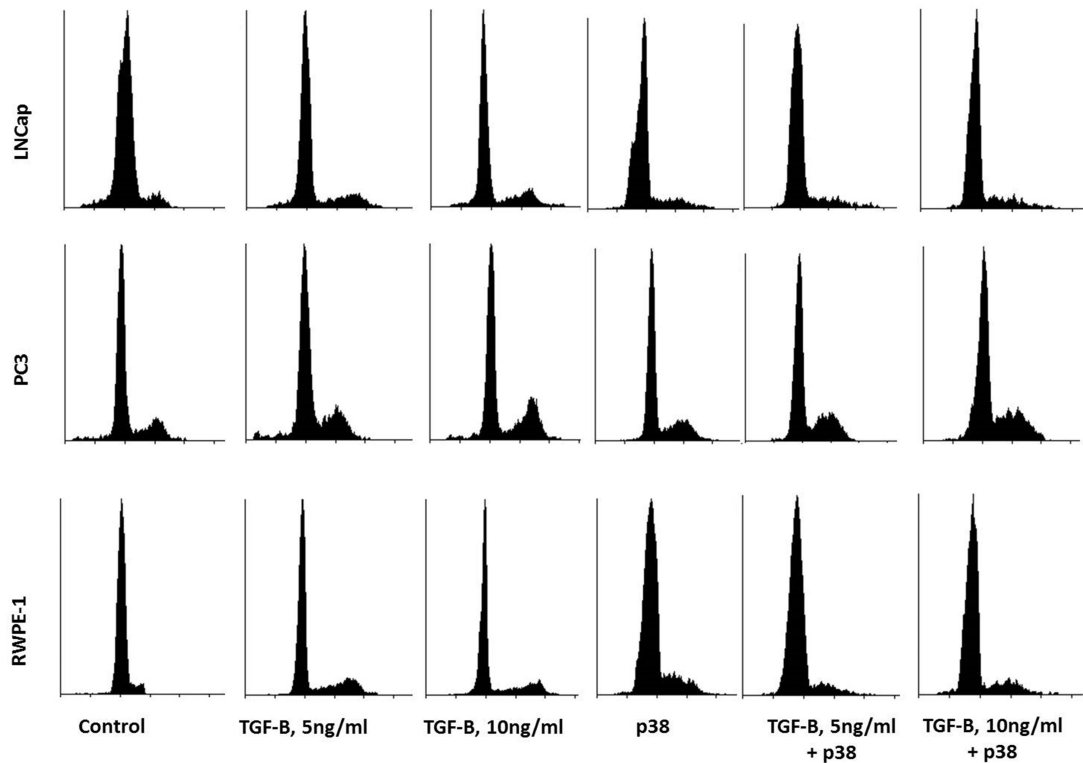


Figura 47. Histogramas de los ciclos celulares de LNCaP, PC3 y RWPE-1. Los resultados fueron obtenidos por citómetro de flujo post tratamiento de TGF-B y el inhibidor p38.

5. Efecto de la inhibición de ERK en la proliferación mediada por TGF-B

Se realizó el ensayo del MTT con el inhibidor ERK (PD98059) a una concentración de 20 μM , en combinación con TGF-B (5 y 10 ng/ml) a 48 h de tratamiento, para estudiar el efecto de dicho inhibidor en conjunto con TGF-B sobre la proliferación celular. En condiciones basales, la inhibición de ERK no tuvo efecto sobre RWPE-1, mientras que sobre PC3 y LNCaP disminuyó la proliferación. Cuando el efecto inhibitorio se combina con TGF-B, también se observa disminución del crecimiento con respecto a las condiciones sin el mismo (Figura 48).

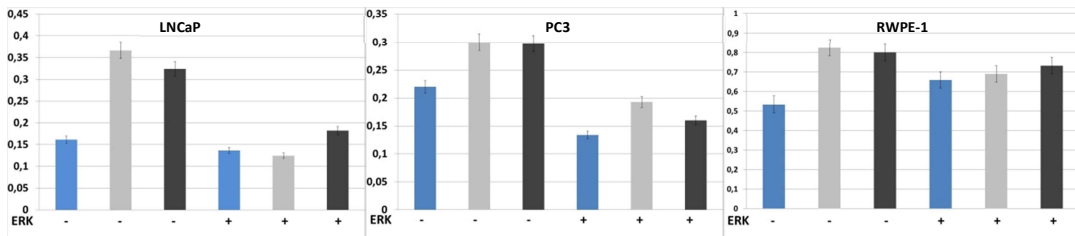


Figura 48. Efecto de la inhibición de ERK en la proliferación mediada por TGF-B. Los gráficos muestran el efecto de TGF-B a 0 ng/ml (azul), 5 ng/ml (gris) y 10 ng/ml (negro) solo o combinado con el inhibidor ERK a una concentración de 10 μM en el tamaño de la población viable de las células LNCaP, PC3 y RWPE-1 medida a 48 h de la adición de la citoquina mediante el ensayo de MTT. Los inhibidores se aplicaron 4 h antes del tratamiento con TGF-B.

6. Inducción de ERK en la proliferación mediada por TGF-B

Para determinar si el inhibidor de ERK frena la proliferación celular en combinación con el TGF-B se realizó un análisis de la población celular mediante citometría de flujo siguiendo el mismo procedimiento del experimento anteriormente explicado. Se observa que en las líneas celulares PC3 y LNCaP, en presencia de TGF-B, se producen aumentos significativos de proporción celular en S+G2/M que coinciden con la disminución en las mismas proporciones de células en G₀/G₁. El efecto del inhibidor por sí solo no arroja cambios significativos con las poblaciones celulares en G₀/G₁ mientras que si disminuye ligeramente el porcentaje de células en S+G2/M. Cuando el inhibidor se combina con la citoquina, no se recupera el efecto proliferativo del TGF-B observado (Figura 49 y 50).

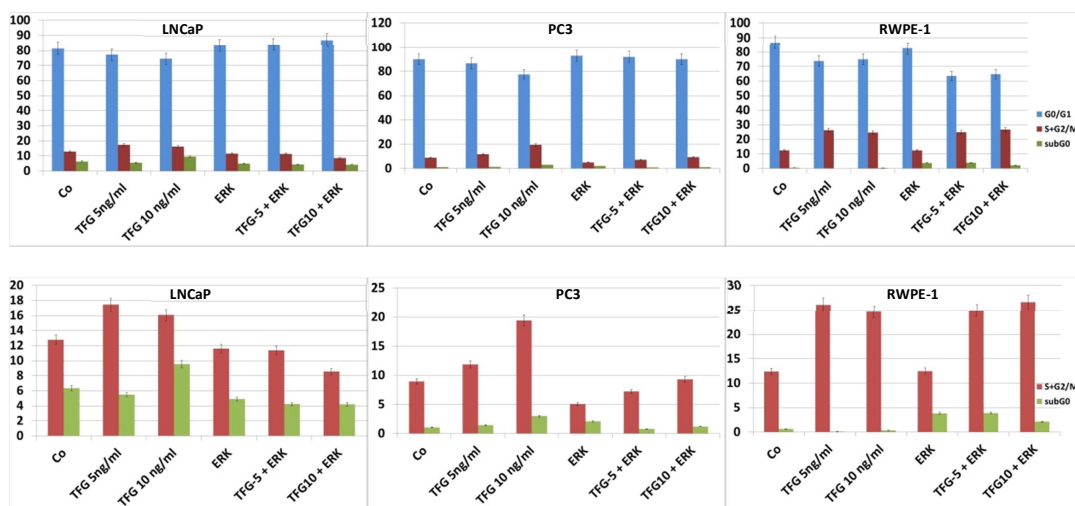


Figura 49. Inhibición de ERK en la proliferación de la fracción celular de LNCaP, PC3 y RWPE-1 mediada por TGF-B.

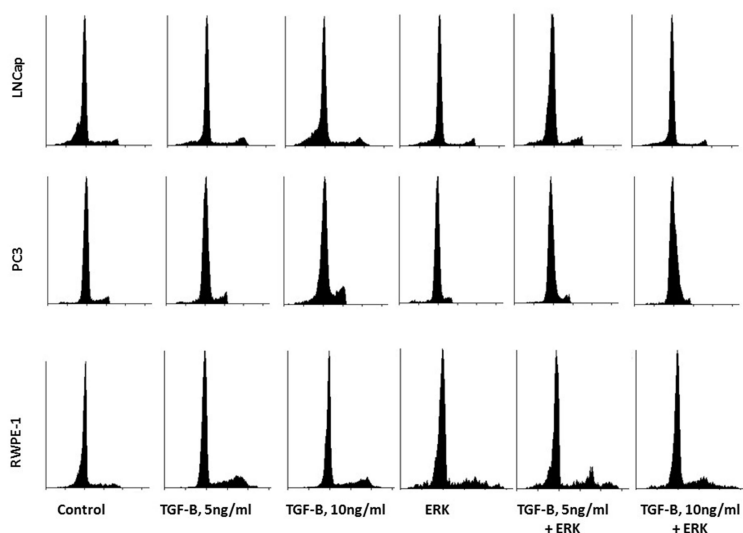


Figura 50. Histograma de los ciclos celulares de LNCaP, PC3 y RWPE-1. Los resultados fueron obtenidos por citómetro de flujo post tratamiento de TGF-B y el inhibidor de ERK

B. EGF

1. Efecto de EGF en el tamaño de la población celular

Primero se determinó el efecto de las concentraciones crecientes de EGF en el tamaño de la población celular de LNCaP viable mediante el ensayo del MTT. Como se muestra en la Figura 51 el crecimiento de las células LNCaP sometidas a privación de andrógenos (CS-FBS) fue menor que las células LNCaP cultivadas en medio completo (FBS). EGF incrementó el crecimiento de las células LNCaP de una manera dependiente de la dosis en el caso de privación de andrógenos, alcanzando una respuesta máxima 2 veces superior después de 6 días de tratamiento con 10 ng/ml de EGF.

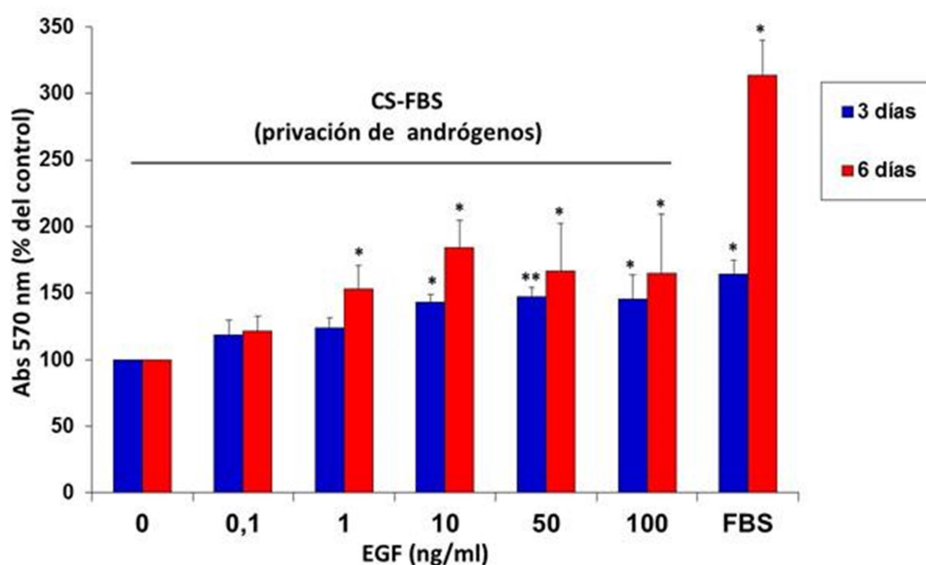


Figura 51. Tamaño de la población de células viables, estimado mediante el ensayo de MTT en los tiempos indicados. Los valores de absorbancia (media \pm SD de cuatro determinaciones) están representados en relación con las células tratadas solo con CS-FBS, que recibió el valor de 100. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; t de Student).

2. Efecto de la privación de andrógenos y EGF sobre la muerte celular

Las células LNCaP cultivadas en medio suplementado con 10% de FBS o expuestas a medio con 10% CS-FBS solo o combinado con 10 ng/ml de EGF. Después de 3 y 6 días de tratamiento, la pérdida de la integridad de la membrana plasmática se estimó mediante la evaluación de PI-céls-permeables (muerte) no se obtuvo variación significativa con los tratamientos (Figura 52). Los perfiles de ciclo celular a los seis días de tratamiento no variaron significativamente (Figura 53).

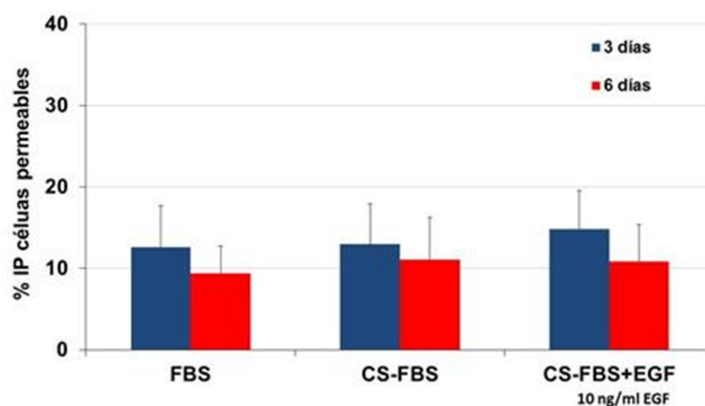


Figura 52. Porcentaje de PI-permeables (células muertas) (media \pm SD de tres determinaciones).

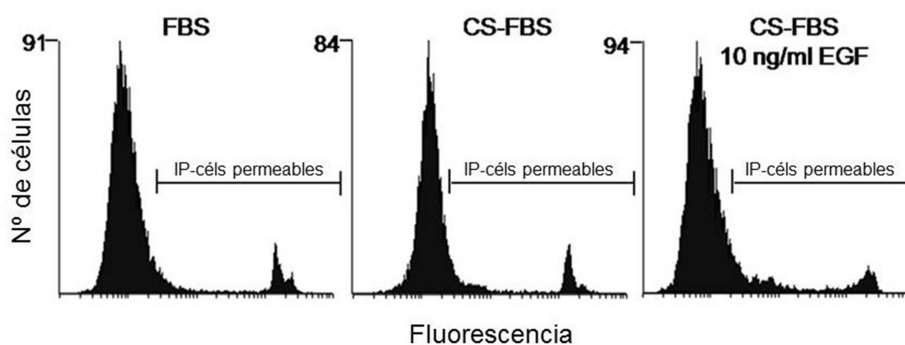


Figura 53. Histogramas de citometría de flujo obtenidos a los 6 días de tratamiento, mostrando las fracciones de las células IP-células permeables.

3. Efecto de la privación de andrógenos y tratamiento EGF sobre la distribución del ciclo celular de células LNCaP

Las células fueron cultivadas en medio suplementado con 10% de FBS o fueron expuestas a un medio que contiene 10% CS-FBS solo o combinado con 10 ng/ml de EGF. La distribución del ciclo celular fue estimada de acuerdo con el contenido de ADN por citometría de flujo. Tras la privación de andrógenos, la proporción de células LNCaP en G_0/G_1 fue mayor que los que se cultivaron en medio FBS suplementado. En el caso de la proporción en S y G_2/M fue más baja (Figura 54 y 55). Aunque hubo una tendencia hacia una disminución de las células en G_2/M , la diferencia no fue estadísticamente significativa.

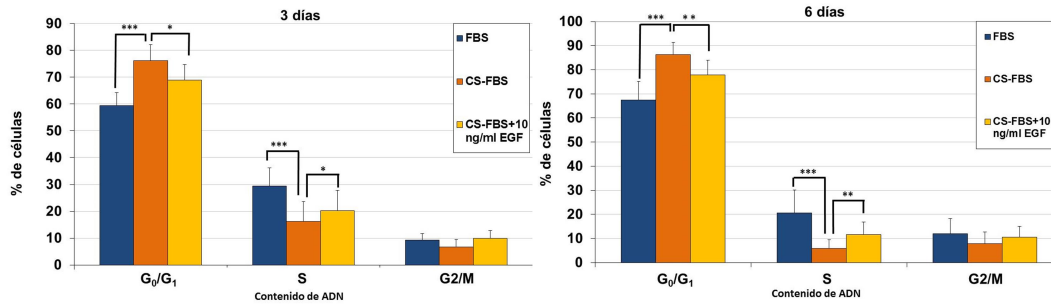


Figura 54. Porcentaje de células en fase G₀/G₁, S y G₂/M del ciclo celular (media ± SD de cuatro determinaciones) a los 3 y 6 días de tratamiento. (* p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0,001; t de Student).

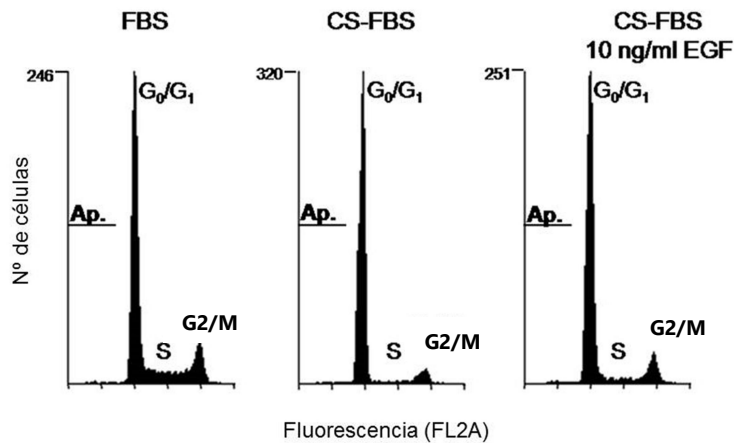


Figura 55. Perfiles de ciclos celulares a los 6 días de tratamiento, mostrando las fracciones de células en las diferentes fases del ciclo celular y las fracciones de células apoptóticas (Ap.).

4. Efecto de la inhibición de p38 MAPK, MEK e Ikk-B en la proliferación inducida por EGF de células LNCaP en condiciones de privación de andrógenos

Para comprender como los marcadores moleculares contribuyen a los efectos proliferativos de EGF sobre el crecimiento de células LNCaP en condiciones de privación de andrógenos, se realizaron ensayos MTT en el que la actividad de p38 MAPK, MEK o Ikk-B se inhibió mediante la aplicación de inhibidores químicos. Se aplicaron 4 h con antelación a la adición de CS-FBS o CS-FBS más EGF. Cuando se inhibe p38, el efecto de EGF en el crecimiento de células LNCaP a los 6 días fue completamente abolido, mientras que no se encontraron diferencias significativas cuando se aplicaron los inhibidores de Ikk-B o MEK (Figura 56). Tal efecto parece ser causado principalmente por bloqueo de EGF, impidiendo la transición de G₀/G₁ a S, ya que el porcentaje de células a lo largo de diferentes fases del ciclo celular

se mantuvo al mismo nivel que el control (privación de andrógenos). Es de descartar que la inhibición de p38 no produjo cambios en la muerte celular, con o sin EGF.

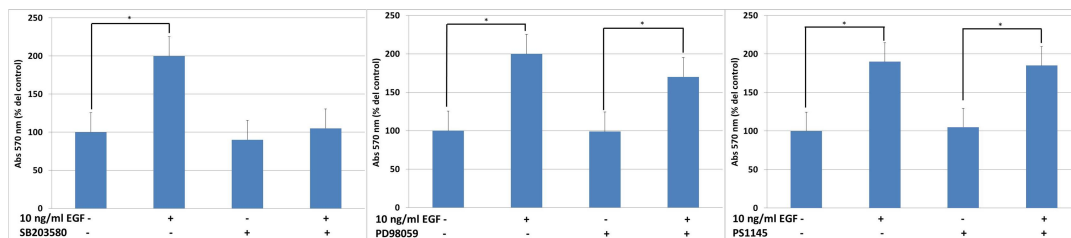


Figura 56. Los valores de absorción (media \pm SD de tres determinaciones) están representados en relación con las células tratadas solo con CS-FBS, que recibió el valor de 100. (* $p < 0.05$; t de Student).

5. Efecto de la inhibición de p38 MAPK y la estimulación de EGF en la fosforilación de Rb y la distribución del ciclo celular de las células LNCaP en condición de deprivación andrógeno

Las células LNCaP se trataron con CS-FBS o CS-FBS más 10 ng/ml de EGF. Antes del tratamiento, las células se incubaron con 10 nM de inhibidor de p38 durante 4 h. El ciclo celular fue evaluado por citometría de flujo. El inhibidor de p38 contrarresta la reducción en la fracción de privación de andrógenos G_0/G_1 en las LNCaP detenido por completo a los 3 días y en menor medida en 6 días de tratamiento (Figura 57). En consecuencia, en virtud del agotamiento de andrógenos, las células tratadas con EGF y el inhibidor de p38 mostró niveles similares de fosforilación de Rb que los de las células no tratadas (Figura 57). Por otra parte, el inhibidor de p38 MAPK no produjo cambios en la muerte celular, ni solo ni en combinación con EGF. Estos hallazgos indican que la p38 MAPK contribuye a inducir la proliferación de las células LNCaP en condiciones de deprivación de andrógeno mediante la promoción de la transición G_0/G_1 a S.

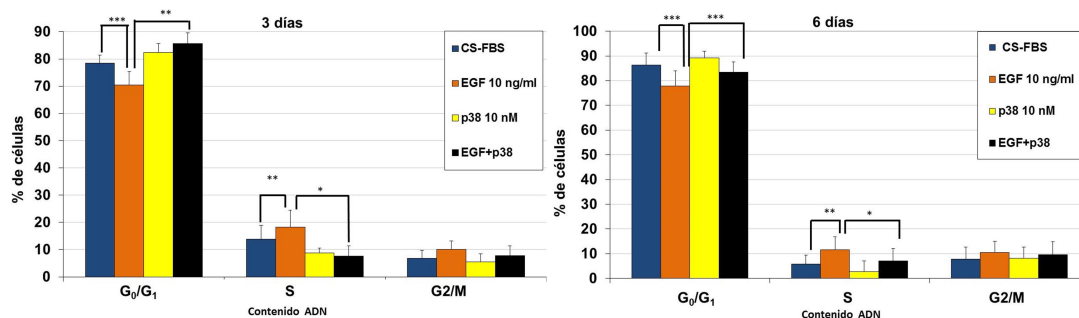


Figura 57. La distribución del ciclo celular fue estimada por citometría de flujo según el contenido de ADN. Los resultados se representan como porcentaje de las células (media \pm SD de cuatro determinaciones) en fase G_0/G_1 , S y G2/M del ciclo celular. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$; t de Student).

IV Discusión

1 Expresión proteica de los componentes de la vía de transducción IL-1a/p38/NF-kB/ATF/AP-1/Elk-1 y su implicación en la próstata normal y la patología prostática

1.1 Expresión de IL-1 y sus receptores

La familia IL-1 está relacionada con procesos inflamatorios en la iniciación y promoción del desarrollo del tumor, así como en la activación y supresión de la inmunidad anti-tumoral. En este estudio, las muestras sin enfermedad prostática no tuvieron expresión para IL-1a, IL-1RII o IL-1Ra y las muestras con patología prostática han mostrado una distribución muy homogénea. Hallazgos similares se han obtenidos en trabajos previos de nuestro grupo (Ricote y cols., 2004; Royuela y cols., 2008).

En esta investigación tanto la frecuencia como la expresión de la familia IL-1a aumentó en HBP y en las muestras con cáncer frente a las muestras de próstata normal y biopsias. Estos datos corroboran resultados publicados de nuestro grupo de investigación reseñando la importancia de esta familia en los procesos inflamatorios (Ricote y cols., 2004; Royuela y cols., 2008). Estudios previos describen que la expresión de IL-1a en las células epiteliales prostáticas en un modelo de ratón transgénico produjo un aumento de tamaño de la próstata y obstrucción de la vejiga (Vital y cols., 2014). Otro estudio que apoya el papel de la IL-1 en el crecimiento prostático describe ausencia de hiperplasia en ratones IL-RI (-/-) a pesar de exhibir infiltrados de células inflamatorias (Hahn y cols., 2014).

Encontramos que la IL-1a mostró una correlación negativa con la invasión perineural, supervivencia y progresión bioquímica. Al contrario, el receptor antagonista IL-1Ra se correlaciona positivamente con la progresión bioquímica. Por otro lado, la expresión en el tumor de IL-1B e IL-1RI está relacionada con el estadio T clínico, mientras que la correlación de IL-1RII fue con el PSA preoperatorio y estadio T clínico. No se han encontrado en la bibliografía consultada datos previos de correlación de estas citoquinas con los marcadores clásicos en cáncer de próstata. Solo trabajos previos de nuestro grupo en otra cohorte de pacientes encontró una relación significativa entre IL-1RII e IL-1B con el PSA y la puntuación Gleason (Rodríguez-Berrigueta y cols., 2013).

Se ha observado retraso en el crecimiento del tumor y una respuesta angiogénica deteriorada en ratones deficientes de IL-1a (Rider y cols., 2013). Sin embargo, en ratones deficientes de IL-1B los tumores aparecieron después de un periodo de latencia prolongado, sin casi respuesta inflamatoria durante el desarrollo tumoral y las células malignas aumentaron su potencial invasivo y metastásico (Voronov y cols., 2013; 2014). Los niveles bajos de IL-1Ra en ascitis se asociaron con mejor pronóstico y supervivencia libre de

progresión (Mustea y cols., 2008). Voronov y cols. (2013) describe la neutralización de la familia IL-1 como posible terapia anti-cáncer.

Estudios recientes con líneas celulares LNCaP describen a la IL-1a como promotor del crecimiento del cáncer de próstata. La IL-1a se ha descrito en otros tipos de cáncer como hígado, colon, pancreático, gástrico o en carcinoma de cabeza y cuello. Podría estar involucrada en la proliferación celular, angiogénesis y metástasis (Matsuo, 2009; León y cols., 2015). Hay pruebas de que el tratamiento con IL-1 afectaría la capacidad del sistema inmune (Dinarello y van der Meer, 2013; Dinarello, 2014). Como la interleuquina-1 es capaz de inducir células supresoras mieloides, su neutralización puede ser beneficiosa si se utiliza en combinación con otros agentes (Dinarello, 2014).

1.2 Expresión de MAPKs

Dentro de las MAP2K estudiamos a la proteína MEK-6, destacando su positividad en las muestras normales y patológicas; y la sobreexpresión en el epitelio glandular. En el cáncer de próstata la frecuencia más alta fue en tumor (95.3%). MEK-6 no se relacionó con ningún marcador clínico-patológico. Resultados similares fueron obtenidos por Lotan y cols. (2007). Utilizando técnicas de inmunofluorescencia, Parray y cols. (2014) recientemente señalaban incrementos de la expresión de MEK-6 en cáncer de esófago, estómago y colon. Por el contrario, disminución de la expresión de MEK-6 se ha relacionado con aumento de la supervivencia de células de cáncer de vejiga en estudios realizados con PCR (Reacción de la cadena de polimerasa) (Otto y cols., 2012).

La expresión de p38 MAPK varía con el grupo de pacientes. Se expresó tanto en las muestras sin patología prostática como en las que adquirieron la patología, incrementándose significativamente la expresión en las muestras con cáncer de próstata. Cuando evaluamos la frecuencia de p38 se observa que es mayor en el tumor que en el estroma, con aumento de los positivos altos. La expresión de p38 disminuye con la puntuación Gleason y se establece una relación inversa y significativa entre estas variables. Con las mismas características se correlacionaron p38 con la implicación de ganglios y la progresión bioquímica. En trabajos previos, realizados en modelos de ratón transgénico para cáncer de próstata, la disminución de la expresión de p38 se relacionó con mal pronóstico (Uzgare y cols., 2003). En cambio, Che y cols. (2013) formularon que la expresión de p38 tuvo una correlación positiva significativa con la carcinogénesis, progresión tumoral y supervivencia. A una conclusión similar llegan Khan y cols. (2016) en cáncer gástrico. La técnica utilizada por Che y cols. (2013) y Khan y cols. (2016) para la determinación de la expresión de p38 fue IHQ, sin embargo, en ambos casos los resultados fueron estatificados de diferente forma. Lo que podría justificar en parte las diferencias con nuestros resultados.

Diferentes autores han demostrado la participación de p38 en la supervivencia de células cancerosas, proliferación y la quimioresistencia (Bakin y cols., 2002; Kim y cols., 2003; Grossi y cols., 2014). Varios estudios han sugerido el importante papel de p38 MAPK en el

cáncer de próstata (Ricote y cols., 2006), mama (Park y cols., 2003), cáncer de vejiga, (Kumar y cols., 2009; 2010), cáncer de hígado (Iyoda y cols., 2003), cáncer de pulmón (Greenberg y cols., 2002) y leucemias (Liu y cols., 2000). La activación de p38 contribuye a la transición epitelio mesenquimal (EMT) en las células del tumor primario, permitiendo la migración de las células y la consecuente invasión (Bhowmick y cols., 2001). La latencia de las células tumorales se ha asociado con alta actividad de p38 MAPK en combinación con baja actividad de la vía ERK1/2 (Koul y cols., 2013). Sin embargo, otros trabajos defienden que la expresión de ambos, ERK1/2 y p38 MAPK, están presentes en los procesos iniciales del cáncer de próstata y la inactivación se produce con la aparición de la metástasis y el fenotipo de independencia de andrógenos en un modelo de ratón transgénico (Uzgare y cols., 2003). En el cáncer renal y de vejiga p38 se relaciona con el grado del tumor y estadio (Ozbek y cols., 2011, 2012).

En nuestros cultivos celulares sometimos a nuestras células a una inhibición con p38 en un medio que posteriormente enriquecíamos con TGF-B. Nuestros resultados demuestran que la acción del inhibidor p38 en las células LNCaP es capaz de inhibir por sí solo la proliferación, incluso por debajo del control. Del mismo modo, también es capaz de inhibir el efecto de TGF-B. No ocurre así en PC3. Por el contrario, este inhibidor podría actuar también aumentando la apoptosis como se ve en LNCaP y RWPE-1. En esta última línea el efecto conjunto de inhibidor y factor revierte el aumento de proliferación producido por TGF-B. Raingeaud y cols. (1995) explican estos resultados debido a que la ruta p38 podría estar inhibida por la doble especificidad de fosfatasas PAC1 y MKP1 que inhiben la actividad de p38.

En nuestros cultivos celulares el tratamiento con TGF-B conlleva un aumento de la fase S+G2/M con respecto al control y una disminución de la fase G₀/G₁. La inhibición de p38 MAPK, pero no de MEK o Ikk-B, anulan la proliferación de las células LNCaP en un medio de andrógenos empobrecido y disminuye la fracción G₀/G₁. La acción de p38 aumenta la activación de AR en respuesta a otros estímulos en ausencia de andrógenos, como la IL-6 (Lin y cols., 2001) o hipoxia (Khandrika y cols., 2009). Estos resultados sugieren potenciar el desarrollo de terapias para el cáncer de próstata avanzado que bloqueen la fase G₀/G₁ hacia la fase S (Rodríguez-Berriguete y cols., 2016).

1.3 Expresión de los factores de transcripción

Numerosos estudios han puesto en evidencia el papel pro-tumoral del factor NF-kB. La activación aberrante de NF-kB se ha observado en muchos tipos de cáncer como el de mama (Zhou y cols., 2007), colon (Cooks y cols., 2013), piel (Sur y cols., 2008), pulmón (Kumar y cols., 2013), esófago (Liu y cols., 2014), páncreas (Yang y cols., 2013) y próstata (Shukla y cols., 2004).

En nuestro estudio al evaluar la expresión de NF-kB p50 en biopsia, próstata normal y patológica, observamos expresión citoplásmica en muestras sin patología mientras que en PIN de alto grado y cáncer se expresa en el núcleo. Lo mismo ocurre con NF-kB p65

aunque este último no se expresó en próstatas normales ni en biopsias. La expresión de ambos se podría relacionar con un aumento de su activación, lo que podría promover la proliferación celular, regulada por la ciclina D1, c-myc o IL-6 (Chen y Goeddel, 2002; Suh y Rabson, 2004); aunque también por otros factores anti-apoptóticos como TRAF-1 y -2 (Shanmugam y cols., 2006), Bcl-xL (Chen y Goeddel, 2002) o proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) (Gyrd-Hansen y Meier, 2010).

Al evaluar la frecuencia de la expresión no se encuentran diferencias entre estroma y tumor en p50 y p65, observando siempre una alta positividad. Para p50 la correlación fue negativa para estadio T patológico, invasión perineural, márgenes y supervivencia. No se observó ninguna relación de p65 con los marcadores clásicos. Labouba y cols. (2015) utilizando técnicas de inmunofluorescencia, encontraron una relación entre la expresión nuclear de p65 y la recurrencia bioquímica.

Aumentos de la expresión de NF-κB en cáncer de próstata se correlacionan con la progresión de la enfermedad y su localización nuclear es predictivo de recurrencia bioquímica y de pobre supervivencia (Ross y cols., 2004; Domingo-Domenech y cols., 2005; Koumakpayi y cols., 2010). Gannon y cols. (2013) realizaron estudios sobre un número importante de pacientes con cáncer de próstata. Utilizando la técnica de microarrays de tejidos observaron una asociación significativa entre el aumento de la frecuencia nuclear de NF-κB p65, puntuación de Gleason, recurrencia de progresión bioquímica y desarrollo de metástasis. Además, en este mismo estudio concluyen que NF-κB se puede considerar un factor predictivo independiente de recidiva bioquímica. Sin embargo, la contribución a la exactitud predictiva de un modelo multivariable incluyendo los marcadores clásicos fue escasa (Gannon y cols., 2013).

Muchos estudios indican que la activación de la señalización de NF-κB en las células del cáncer de próstata se correlaciona con la progresión de la enfermedad, incluyendo la quimioresistencia, cáncer resistente a castración, recurrencia del PSA y diseminación metastásica (Lessard y cols., 2005; Grivennikov y cols., 2010; McCall y cols., 2012). Huber y cols. (2004) demostraron que NF-κB contribuye a la progresión del cáncer de mama mediante el control de la transición epitelio mesenquimal y la metástasis.

En líneas celulares de cáncer de próstata y en modelos de xenoinjerto, los mayores niveles de NF-κB se observaron en las células de cáncer de próstata refractario a los andrógenos en comparación con los sensibles a andrógenos (Suh y cols., 2002). Trabajos más recientes de Jin y cols. (2014) utilizando modelos de ratón transgénico con aumento de la actividad de NF-κB y pobre en andrógenos, proponen que la ruta de NF-κB activada predispone a pacientes con cáncer de próstata a fracaso de la terapia de privación de andrógenos convirtiéndose en metastásico y castró resistente.

Elk-1 es miembro de la familia de factores de transcripción que juega un papel importante tanto en las condiciones fisiológicas como en las patológicas de la glándula prostática. En esta investigación la expresión de p-Elk-1 se incrementa con la patología y el número de

muestras positivas disminuye en hiperplasia y cáncer. La frecuencia de la expresión de p-Elk-1 fue mayor en el tumor que en el estroma. Kawahara y cols. (2016) señalan en estudios recientes que los niveles de expresión de Elk-1 fueron significativamente mayores en carcinoma que en HBP o neoplasia intraepitelial prostática, así como la expresión fue mayor en PIN de alto grado que en HBP. Similares resultados fueron descritos por Ricote y cols. (2006). Otros trabajos, utilizando PCR a tiempo real, indican que no encontraron ninguna diferencia de expresión entre próstata normal y patológica (Shaikhibrahim y cols., 2011). Además, encontramos una relación inversa entre la expresión de Elk-1 con la puntuación Gleason y la supervivencia. Estos resultados coinciden con trabajos previos (Kawahara y cols., 2016). Sin embargo, no tuvimos ninguna relación con la progresión bioquímica como es referido por Kawahara y cols. (2016).

En cáncer de mama, Booy y cols. (2011) reportaron una correlación entre los niveles de p-Elk-1 y Mcl-1. Indicaron que EGF induce la activación de Elk-1 y que es un importante mediador de la expresión de Mcl-1 y supervivencia celular.

Estudios experimentales en próstata ventral de ratas muestra que la reducción de p-Elk-1 se asocia con una mejora en la apoptosis (Huynh, 2002), mientras que su presencia en líneas celulares de próstata DU145 y PC-3, se correlaciona con proliferación (Xiao y cols., 2002; Amorino y Parsons, 2004).

ATF-2 forma parte de la red de factores de transcripción que funcionan en circunstancias normales y patológicas como en la progresión del tumor. Algunos investigadores afirman que la pérdida funcional de ATF-2 podría tener más una función de cooperación en lugar de un papel iniciador en múltiples etapas del proceso tumorigénico (Zoumpourlis y cols., 2000; Bhoumik y cols., 2008). Cuando evaluamos la expresión y el porcentaje de positividad de p-ATF-2 observamos que el porcentaje de muestras positivas fue similar en biopsias y próstata normal, y se reduce en la HBP. También disminuye en cáncer con respecto al PIN, localizándose tanto en el citoplasma como en el núcleo en PIN y cáncer. La frecuencia de p-ATF-2 es la misma en el estroma y en el tumor a expensas de los positivos altos. El incremento de la expresión de p-ATF-2 en el estroma se relaciona con disminución de la invasión perineural, estadio clínico y aumento de las concentraciones del PSA. Ricote y cols. (2006) publicaron que el aumento de localización citoplasmática de p-ATF-2 en muestras de cáncer se correlaciona con la progresión clínica de la enfermedad.

Estudios realizados por Deng y cols. (2008) con radiación ionizante de las células del cáncer de próstata mostraron que la radiación ionizante puede inducir la localización citoplasmática de ATF-2 en contraste con su localización nuclear predominante durante la condición basal.

Nuestros resultados muestran que la expresión de Ap-1 se observa solo en el citoplasma de PIN y cáncer de próstata, y en el núcleo en HBP. No se expresó ni en biopsias ni en próstatas normales. Aumentos de la expresión de AP-1 en HBP se han relacionado con incremento de STUI (Síntomas del tracto urinario inferior), resistencia a la terapia y la

progresión a la cirugía (Lin-Tsai y cols., 2014). Cuando evaluamos la frecuencia en cáncer de próstata no encontramos diferencias entre estroma y tumor, destacando la alta expresión de AP-1 en ambos y su expresión se correlaciono con el estadio T patológico. La expresión nuclear de AP-1 ha sido asociada positivamente en las primeras etapas del tumor colorrectal humano (Takeda y cols., 2008).

Kajanne y cols. (2009) demuestran que la actividad constitutiva AP-1 en células de cáncer de próstata depende de la actividad de EGFR y PI3K, y confiere protección contra la muerte celular inducida por radiación. Por lo tanto, su inhibición sería un objetivo beneficioso para la terapia en este tipo de cáncer.

1.4 Expresión de la familia Bcl-2

La familia de las proteínas Bcl-2 juegan un papel regulador crucial en la apoptosis, tumorigénesis, mantenimiento del tumor y metástasis, así como en la respuesta de los cánceres a quimioterapias clásicas y terapias dirigidas (Hata y cols., 2015; Ren y cols., 2015). En esta investigación, los resultados de biopsias normales de pacientes que posteriormente desarrollaron cáncer no fueron diferentes de los obtenidos en muestras normales. En ningún caso se observó algún tipo de correlación con el desarrollo posterior del tumor. La sobreexpresión de Bcl-2 que detectamos está íntimamente ligada a la malignidad, siendo así mayor en patologías como PIN o cáncer, y su expresión mayor en el epitelio que en el estroma. Baspinar y cols. (2014) obtienen resultados similares y correlacionan la expresión con la puntuación Gleason. Por el contrario, nosotros encontramos que Bcl-2 se relacionó directamente con el estadio T patológico, los márgenes quirúrgicos y la supervivencia. Anvari y cols. (2012) realizaron un estudio para evaluar la correlación de la expresión de Bcl-2 y Bax con la supervivencia bioquímica en los pacientes con carcinoma de próstata avanzado o metastásico sometidos a terapia de privación de andrógenos. Dicho estudio concluyó que la alta expresión de Bcl-2 se asoció con mayor puntuación de Gleason y menor supervivencia libre de progresión bioquímica. Por otro lado, Nariculam y cols. (2009) en estudios hechos en microarrays de tejido no encontraron ninguna asociación entre Bcl-2 y recidiva bioquímica tras prostatectomía radical y sugieren que este marcador no tiene ningún valor como marcador pronóstico. Similares resultados son descritos en trabajos posteriores donde evaluaron una cantidad importante de muestras de próstata post prostatectomía (Miyake y cols., 2010; Baseskioglu y cols., 2010).

Respecto a la proteína Bax hemos encontrado que se expresó en la mitad de las muestras de próstata normal y patológica. Solo destaca un leve aumento de la frecuencia en PIN. La expresión fue mayor en el epitelio glandular. En cáncer, la expresión fue mayor en el tumor que en el estroma. El aumento de la intensidad de Bax se relacionó significativamente con el incremento en la implicación de ganglios. Amirghofran y cols. (2005) encontraron una correlación significativa entre la expresión de Bax y el estadio del carcinoma prostático. Chia y cols. (2000) también mostraron que los pacientes que expresaron Bax tenían

significativamente peor supervivencia a largo plazo que los pacientes que no lo expresaban. Este resultado no es el esperado, ya que la proteína Bax promueve la muerte celular. Krajewska y cols. (1996) describieron que la expresión de genes anti-apoptóticos Mcl-1 y Bcl-2 aumentan durante la progresión de muchos cánceres de próstata, mientras la expresión de la proteína pro-apoptóticas Bax sigue siendo relativamente constante.

En esta investigación, la positividad de PUMA en próstata normal y biopsias fue similar incrementándose al adquirir la patología. En HBP y PIN la expresión llegó al 100% de las muestras. En el cáncer de próstata no encontramos ningún tipo de correlación entre PUMA y los marcadores clásicos. Shu y cols. (2013) hallaron en adenocarcinomas de vesícula biliar que aumentos significativos de la expresión de PUMA se correlacionaban con progresión rápida, metástasis, invasión y mal pronóstico. En cambio, Zhou y cols. (2015) no encontraron ninguna asociación entre la disminución de la expresión de PUMA y las características de tumor más agresivo en carcinoma de células renales. Sin embargo, Peng y cols. (2015) hallaron en carcinoma hepatocelular, que la débil expresión de PUMA se asociaba significativamente con estadio avanzado y recurrencia. La ablación de PUMA en ratones conduce a la disminución de la apoptosis y el aumento de la carga tumoral y la invasión en el tracto gastrointestinal (Qiu y cols., 2009). Contradictoriamente, Diallo y cols. (2007), al evaluar la expresión pro-apoptótica de PUMA en tejidos de la próstata, afirmaron que la expresión de PUMA fue mayor en el cáncer sensible a hormonas pero que PUMA por sí sola no podría predecir la aparición de la progresión bioquímica. Deficiencias en PUMA pueden causar resistencia a la radiación y quimioterapia (Zhang y Yu, 2013).

En esta investigación, entre las proteínas de carácter anti-apoptótico estudiadas, Bcl-xL se encuentra sobreexpresada en todas las muestras tanto sin patología como en patologías benignas, pre-malignas o malignas. Si bien es cierto que en cáncer descendió el número de muestras positivas. En estudios previos se observó una sobreexpresión de Bcl-xL relacionada con neoplasias y procesos cancerígenos en el mieloma múltiple o la resistencia terapéutica en leucemia mieloide crónica (Horita y cols, 2000); así como promotor de invasión y procesos metastásicos en tumores pancreáticos (Hager y col., 2009), de mama (España y cols., 2004) o pulmón (Fernández y cols., 2000). Encontramos que la sobreexpresión de Bcl-xL se correlacionó con menor supervivencia en las muestras de cáncer de próstata. Resultados similares se han obtenido en carcinoma urotelial del tracto urinario superior (Yoshimine y cols., 2013) o cáncer de ovarios (Lin y cols., 2013). Zhang y cols. (2014) en estudios realizados en cáncer de lengua, encontraron aumentos de la expresión de Bcl-xL en carcinoma frente a tejidos normales de lengua, así como una asociación positiva con el grado de diferenciación y la estadificación TNM clínico, pero negativamente correlacionada con el grado de malignidad del tumor. Esta proteína puede estar asociada a la escasa efectividad de la función pro-apoptótica de proteínas como Bax o Bim. Además, se ha descrito su participación en la inactivación del apoptosoma en cáncer pulmonar (Moravcikoma y cols, 2014).

En este estudio, Nova se expresó principalmente en el epitelio glandular de todas las muestras no patológicas y PIN. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas de las frecuencias de la expresión de Nova en el cáncer de próstata entre estroma y tumor. En el estudio de correlación de esta cohorte, Nova tuvo una relación directa con los márgenes quirúrgicos. Estudios previos asocian aumento de la expresión de Nova con la progresión del cáncer de próstata, alcanzando los más altos niveles en cáncer de próstata hormono resistentes y fue predictivo de progresión bioquímica (Diallo y cols., 2007).

En esta investigación, los porcentajes de positividad de Bad y Bim aumentaron con la patología, siendo más significativo en Bim. La expresión de ambas proteínas, Bad y Bim, fue mayor en el epitelio glandular que en el tumor. Sin embargo, la frecuencia fue mayor en el tumor. Los niveles de expresión de Bad parecen no variar en los diferentes grupos a pesar de que sí se observa un incremento de la densidad óptica y su expresión no se relacionó con ningún marcador clásico. Aumentos en la expresión de Bim se relacionaron con menor concentración de PSA sérico preoperatorio.

Los resultados obtenidos en la expresión de las proteínas Bim y Bax se corresponden con los resultados hallados en estudios previos de otros grupos (Gogada y cols., 2013; Um, 2015), en los que se ha descrito una sobreexpresión de Bim en células cancerígenas o precancerígenas (PIN) y una débil expresión de Bax. Así mismo, en estos estudios se ha postulado la posible participación de Bim en procesos de supervivencia celular a pesar de sus cualidades pro-apoptóticas (Gogada y cols., 2013). Teo y cols. (2007) realizaron un estudio retrospectivo con pacientes con cáncer de próstata que tuvieron una respuesta inicial a la terapia de privación de andrógenos, pero posteriormente recayeron con cáncer de próstata independiente de andrógenos. Estos mismos investigadores observaron que disminuciones en la expresión de Bad y Bax se asociaba con la recaída bioquímica en un ambiente de privación de andrógenos y peor supervivencia global. Estos datos podrían indicar que Bad puede ser un posible marcador pronóstico del cáncer de próstata y una diana terapéutica para el carcinoma.

Bad es un regulador crítico de la apoptosis dirigida por la señalización de PI3K. Los receptores de tirosinas quinasas y los receptores acoplados a proteína G (G protein-coupled receptors) pueden fosforilar a Bad, incluso cuando la vía PI3K está inactiva, permitiendo que las células evadan la apoptosis. Esto hace de Bad un biomarcador útil para predecir la eficacia anti-tumoral de los inhibidores de PI3K (Yancey y cols., 2013). Cekanova y cols. (2015) en trabajos realizados en cáncer de mama corroboran que la inhibición de Bad por siRNA aumenta la invasión y los niveles de Akt. Bad es capaz de inhibir la vía de señalización Ras/MEK/ERK y JNK sin afectar a la vía de señalización de p38. Además, Bad transmite efectos anti-metastáticos y es un valioso marcador pronóstico en cáncer de mama.

A la vista de nuestros resultados y de acuerdo con Adams y Cory (2007) y Gogada y cols. (2013), es posible que la señal de Bad pueda resultar insuficiente en procesos patológicos

donde las proteínas de carácter pro-apoptótico se encuentran sobreexpresadas, mientras que la actuación de Bim queda enmascarada bien por la escasa cantidad de Bax disponible puesto que se encuentra unida a proteínas anti-apoptóticas como Bcl-1 o Mcl-1, o bien porque su sobreexpresión en cáncer está ligada a la aparición de polimorfismos en la propia proteína, lo que recae en la pérdida de su función.

2 Expresión proteica de los componentes de la vía de EGF/IL-6/MEK/ERK y su implicación en la próstata normal y la patología prostática

2.1 Expresión EGF y su receptor

La expresión de EGF y EGFR ha sido anteriormente estudiada. Diferentes autores han descrito una mayor expresión en las muestras patológicas en comparación con muestras no patológicas (De Miguel y cols., 1999; Rose-John, 2012). Hemos encontrado que la expresión de EGF fue mayor en próstata normal y en biopsias en comparación con las muestras patológicas y no hubo expresión en el estroma. La disminución de la expresión en EGFR fue menos acusada, con excepción de la expresión en HBP (57.1%). En la bibliografía encontramos resultados contradictorios. EGFR se sobreexpresa en el 40-80% de las células del cáncer de próstata (Shuch y cols., 2004), posiblemente como consecuencia de mutaciones que pueden ocurrir en dicho receptor (Hanahan y Weinberg, 2001). Peraldo-Neia y cols. (2011) describen sobreexpresión de EGFR en el 36% de las muestras de cáncer de próstata, y las mutaciones se encontraron en el 13% de las muestras con cáncer.

En este estudio cuando analizamos la correlación entre la inmunohistoquímica y características clínicas establecidas se obtuvieron relaciones significativas entre aumento de la expresión de EGF con el estadio T patológico y puntuación Gleason; y disminuciones de la expresión solo con supervivencia. Por el contrario, su receptor se relaciona con la invasión perineural y estadio T clínico para esta cohorte de pacientes. Con respecto a la puntuación Gleason, EGF disminuye con el grado mientras que EGFR aumenta. Estudios anteriores apoyan resultados similares y añaden que EGFR contribuye a la progresión del cáncer de próstata (Gregg, 2011). La expresión EGFR también se ha correlacionado con puntuación Gleason en estudios previos (Syed, 2003). Peraldo-Neia y cols. (2011) sugieren que los pacientes con tumores y alta expresión de EGFR experimentaron un aumento significativo del riesgo de recaída bioquímica en comparación con los pacientes con tumores que expresan bajos niveles de EGFR. El análisis de microarrays no reveló diferencias en la expresión génica entre los tumores con alta expresión de EGFR y baja expresión de EGFR (Peraldo-Neia y cols., 2011).

Lorenzo y cols. (2003) y Zellweger y cols. (2005) describieron cómo la sobreexpresión de EGFR en pacientes con cáncer de próstata se asocia con el desarrollo de un tumor androgénico independiente. Trabajos previos describen la capacidad de EGF de contrarrestar el efecto supresor de la privación de andrógenos en células LNCaP (MacDonald y Habib, 1992; Sherwood y cols., 1998). En nuestros estudios *in vitro* observamos que el crecimiento de las celulares LNCaP sometidas a privación de andrógenos (CS-FBS) fue menor que las células LNCaP cultivadas en medio completo (FBS). Y que la proliferación en las células LNCaP se incrementó con la dosis de EGF en el caso de privación de andrógenos, duplicando la población después de 6 días de tratamiento. Al estudiar el efecto de la privación de andrógenos y EGF sobre la muerte celular, la proporción de células con alteración de la permeabilidad de la membrana (como lo demuestra el ensayo de incorporación IP) no varió significativamente con CS-FBS O CS-FBS+EGF, demostrando que la muerte celular no contribuye a los cambios en la población de células LNCaP.

Se evaluó el efecto de la privación de andrógenos y el tratamiento de EGF sobre la distribución del ciclo celular. En la línea celular LNCaP bajo privación de andrógenos se induce la detención en la fase del ciclo celular G_0/G_1 y EGF participaría en esta detención sin afectar la muerte celular. EGF induce la proliferación de líneas celulares de cáncer de próstata en ausencia de andrógenos, a través de vías RA-dependientes e independientes (MacDonaid y Habib, 1992; Sherwood y cols., 1998; Ponguta y cols., 2008). Este factor es capaz de promover el crecimiento de las células del cáncer de próstata RC, siendo los mediadores que intervienen en este proceso poco conocido. En apoyo del papel de EGF en el cáncer de próstata resistente a castración, los receptores de EGF (HER-1 y HER-2/neu) se sobreexpresan en cánceres resistentes a castración. En tumores de próstata metastásico se han correlacionado con resultados pobres (Hernes y cols., 2004; Lorenzo y cols., 2002; Zellweger y cols., 2005). De igual manera, Knudesen y cols. (1998) encontraron que la eliminación de andrógenos produce la detención en fase G_1 en las células LNCaP *in vitro*, vinculados a los cambios que se han asociados a la represión en fase G_1 a S, tales como la disminución del Rb hiperfosforilada y p130 o la supresión de la actividad de la quinasa dependiente de ciclina CDK4 y CDK2. La señalización de EGF está mal regulada con frecuencia en el cáncer de mama y conduce a un aumento en la proliferación y la supervivencia (Booy y cols., 2011). En el cáncer de mama, la activación inducida por EGF de la vía Ikk/NF- κ B se ha demostrado que contribuye a la autonomía de crecimiento de células negativas para receptor de estrógeno, lo más probable mediante la promoción de la fase G_1 a la fase S (Biswas y cols., 2000).

Cuando estudiamos *in vitro* el efecto de la inhibición de p38 MAPK, MEK e Ikk-B en la proliferación inducida por EGF en condiciones de privación de andrógenos, la inhibición de p38 MAPK, pero no MEK o Ikk-b, invalidó completamente la proliferación inducida por EGF en las células LNCaP. Tal efecto parece ser causado principalmente por el bloqueo de la EGF que induce la transición de G_0/G_1 a la fase S, dado que el porcentaje de células a lo

largo de las diferentes fases del ciclo celular se conservó al mismo nivel que el control (privación de andrógenos). La inhibición de p38 no produjo cambios en la muerte celular. Por lo tanto, p38 MAPK parece ser un mediador crítico en la inducción de la transición G₀/G₁ a fase S por EGF en privación de andrógenos. Se ha demostrado que p38 MAPK es capaz de fosforilar y activar RA en respuesta a EGF de una manera independiente del ligando en células LNCaP (Mukherjee y Mayer, 2008). De forma similar, p38 MAPK se ha demostrado que aumenta la activación y/o expresión de RA en respuesta a estímulos en ausencia de andrógenos. Estos resultados sugieren que diferentes estímulos utilizan la señalización p38 MAPK como un elemento común que conduce la proliferación de células de cáncer de próstata en condiciones de andrógeno deprivación, con implicaciones terapéuticas importantes. EGF puede tener efecto sobre el ciclo celular de las células de cáncer de próstata, ya que es capaz de promover la progresión del ciclo celular de G₀/G₁ a S. También demostró la necesidad de p38 MAPK en este proceso. Por lo tanto, el EGF y otros ligando peptídicos podrían contribuir a la aparición de CR al permitir la privación de andrógenos inducida por G₀/G₁ detenido a las células de cáncer de próstata para avanzar a través del ciclo celular. Se plantea la hipótesis de que las terapias de bloque de la transición G₀/G₁ a S, posiblemente orientadas a p38 MAPK, podrían inducir la apoptosis de células cancerosas detenidas en G₀/G₁ mejorando las terapias de privación de andrógenos o para el tratamiento de cáncer de próstata resistente a castración.

2.2 Expresión de IL-6/gp130

La expresión de IL-6 se ha observado en el 100% de las muestras de próstata normales, resultados similares a los descritos por Giri y cols. (2001). La localización de gp-130 en el epitelio glandular de todas las muestras de PN, sugiere que IL-6 tiene una actuación de forma paracrina sobre próstata normal. IL-6 se localizó en el epitelio y en estroma de HBP, quizás producida por estas células, actuando de una manera paracrina. En cáncer de próstata la IL-6 se encontró en epitelio y estroma. La IL-6 permite evadir la vigilancia del sistema inmune, a través de la inhibición de la inmunidad natural y la inducción de la disfunción inmunitaria.

La expresión de gp130 es menor en HBP (57.1%) y no presentó diferencias significativas entre PIN y cáncer. Con respecto a la correlación se observó que se relaciona de manera directa con el estadio T clínico y la implicación de ganglios, y de manera inversa con la supervivencia. Shariat y cols. (2008) encontraron que los niveles plasmáticos de gp-130 se asociaban con características de cáncer de próstata biológicamente agresivo. En trabajos posteriores los niveles plasmáticos de gp-130 se asociaron significativamente con un mayor grado de Gleason, invasión de vesículas seminales, metástasis de los ganglios linfáticos y recurrencia bioquímica, siendo independiente de los niveles séricos de la IL-6 (Shariat y cols., 2011). Sin embargo, cuando Alcover y cols. (2010) miden los niveles séricos de IL-6 y sIL-6R en 96 pacientes con cáncer de próstata obtienen que los niveles de IL-6 pueden

predecir recurrencia bioquímica. Katta y cols. (2003) apuntan que los valores plasmáticos de sIL-6R antes del tratamiento es un predictor útil de la progresión bioquímica.

Se ha sugerido un papel fisiopatológico de la IL-6 en la progresión del cáncer de próstata. Esto ha sido apoyado por investigaciones *in vitro* e *in vivo* que conducen a la idea de que las terapias anti-citoquinas podrían representar un intento prometedor para ralentizar la evolución de la enfermedad (Santer y cols., 2010). Altos niveles de IL-6 y de sus receptores en suero y plasma se consideran indicadores de mal pronóstico incluyendo aumento del volumen del tumor, puntuación Gleason elevada, enfermedad refractaria, metástasis y disminución de la supervivencia (Nakashima y cols., 2000; Kanazawa y cols., 2007; Azevedo y cols., 2011).

2.3 Expresión de Raf-1, MEK y ERK

En el caso de la proteína Raf-1, en este estudio observamos que no se expresó en muestras de próstatas normales, sin embargo, el porcentaje de positividad y la expresión aumentó con la patología, no observándose diferencias significativas de frecuencia de la expresión entre estroma y tumor. Aumentos en la expresión de Raf-1 se asocian con disminución de la supervivencia. La correlación de Raf-1 fue directa con el estadio T clínico.

Mukherjee y cols. (2005) observaron que aumentos en la expresión de Raf-1 en pacientes con cáncer de próstata insensible a andrógenos (AIPC) tenían tiempos significativamente más cortos hasta la recaída bioquímica en comparación con aquellos cuya expresión de Raf-1 se redujo o se mantuvo sin cambios. Por otro lado, resultados de McCubrey y cols. (2006) muestran que algunas células de cáncer de próstata avanzado expresan niveles elevados de Akt activado que pueden suprimir la activación de Raf. En tejidos de ratones transgénicos la expresión dirigida de las formas activadas de C-Raf o B-Raf estimularon la tumorigénesis de pulmón, piel, tiroides y próstata (Knauf y cols., 2005; Leicht y cols., 2007; Jeong y cols., 2008). Chen y cols. (2011) concluyen que la expresión de Raf podría ser un biomarcador pronóstico independiente del cáncer hepatocelular, pudiendo predecir recurrencia y muerte temprana.

En este estudio la expresión de MEK-1 disminuye con la patología y no se observó en biopsias y PN. En cambio, la expresión de p-MEK aumenta en PIN e HBP. También hay diferencias en la expresión de p-MEK entre epitelio y estroma siendo en este último menor. Cuando se evaluó la frecuencia no se observaron diferencias entre estroma y tumor para MEK-1 y su forma activada. Aunque la mayor frecuencia se observó en los positivos altos de p-MEK. No se encontró ninguna relación de MEK y p-MEK con las características clínico-patológicas. Resultados similares han sido descritos en cáncer hepatocelular, gastrointestinal y tumor maligno de la vaina del nervio periférico (Chen y cols., 2011; Schoppman y cols., 2013). Sin embargo, trabajos realizados en cáncer de ovario encontraron correlación significativa entre supervivencia y MEK-1 señalando que MEK-1 podría ser biomarcador independiente de baja supervivencia (Rahman y cols., 2013; Pénczváltó y cols., 2014).

Aunque MEK-1 y MEK-2 rara vez está mutados en cáncer, Estep y cols. (2007) señalan que en cáncer de ovario las mutaciones de MEK1/2 pueden ser comunes. Numerosos estudios han puesto en evidencia el papel pro-tumoral de MEK1/2. Por ejemplo: en trasplante ortotópico de células epiteliales mamarias o intestinales que expresaban MEK1/2 activado que induce la formación de tumores agresivos que progresan hasta la fase metastásica (Pinkas y Leder, 2002; Voisin y cols., 2008). MEK-1 y MEK-2 poseen características únicas que les permite ser un objetivo terapéutico clave en cáncer. MEK1/2 tienen una especificidad de sustrato ERK1/2 y poseen una ventaja estructural única para el diseño de inhibidores ATP no competitivos, que bloquean a MEK1/2 en un estado catalíticamente inactivo (Ohren y cols., 2004; Fischmann y cols., 2009; Wu y Park, 2015).

Dentro de la familia MAPK, la cascada de ERK constituye una importante vía de señalización, y su mala regulación contribuye a la iniciación y progresión del cáncer (Torii y cols., 2006; McCubrey y cols., 2007). Las proteínas ERK1/2 están asociadas con progresión del cáncer y tumorigénesis (Chang y cols., 2014).

Cuando se estudió la expresión de las ERKs, ésta aumentó con la patología incluyendo las biopsias. La positividad se incrementó en ERK-1 y disminuyó en ERK-2 y p-ERK. En las biopsias solo la disminución de la positividad se observó en la expresión de p-ERK. La correlación fue inversa entre ERK-1 con los márgenes quirúrgicos positivos y la implicación de ganglios. Por el contrario, p-ERK se relaciona de manera directa con PSA, estadio T patológico y de una manera inversa con la supervivencia.

Otros autores, como Imada y cols. (2013) señalan que la expresión ERK-2 fue un factor pronóstico independiente para la progresión del cáncer de próstata. También, Gioeli y cols. (1999) correlacionaron las formas fosforiladas de ERK1/2 con aumento de tumor.

La vía ERK1/2 también puede ser activada por MEK en los tumores sólidos, incluyendo melanoma, colon y carcinoma de pulmón (Marks y cols., 2008; Murugan y cols., 2009). Terapias dirigidas hacia los componentes de la vía MAPK/ERK tienen tasas de respuestas variables cuando se utilizan en diferentes tumores sólidos, como el cáncer colorrectal y cáncer de ovario (Burotto y cols., 2014). La activación de ERK en la transcripción del factor Elk-1 es crítica para la regulación de la transcripción de Mcl-1 después del tratamiento con EGF y también tiene un papel importante en la supervivencia celular mediada por EGF en el cáncer de mama (Booy y cols., 2011).

En el cáncer colorrectal ERK activado posiblemente podría estar implicado en la invasibilidad tumoral, así como en la adquisición de un fenotipo más agresivo en carcinoma urotelial de la vejiga (Karlou y cols., 2009), cáncer colorrectal (Levidou y cols., 2012) y esófago (Tasioudi y cols., 2012). En cánceres de próstata sometidos a terapia de privación de andrógenos se observa aumento de la actividad de ERK1/2 y que además se correlaciona con regulación a la baja de receptores de andrógenos (Hong y cols., 2011).

La sobreexpresión de TGF- β fue simulada en los cultivos celulares mediante el sometimiento de las líneas celulares a tratamiento con TGF- β . Según lo esperado se observó un aumento de proliferación mediante ensayos con MTT y citometría de flujo. Su mecanismo de actuación es complejo, pues este factor actúa sobre numerosas cascadas de activación mediadas por las MAPKs. Una de estas cascadas es la ruta de ERK, proteína sobreexpresada en cáncer de próstata (Royuela y cols., 2002), además de ser una MAPK involucrada en procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Kholodenko y Birtwistle, 2009). Tras la observación de los efectos del tratamiento con TGF- β se simuló el microambiente prostático en los cultivos celulares, situación que se intentó revertir con la inhibición de ERK. Los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado, pues ERK revierte el efecto proliferativo de TGF- β en la línea celular PC3 pero no en LNCaP. Esto puede ser debido a la diferente respuesta a andrógenos de ambas líneas celulares, pues se ha descrito que la activación de ERK media la activación de RA a través de receptores tirosina quinasa de factores de crecimiento en líneas celulares independientes de andrógenos en células de cáncer de próstata como las PC3 (Grossmann y cols., 2001).

Pese a las diferencias significativas aportadas en el porcentaje de células en división (S+G2/M) vs apoptosis (G₀/G₁) y sus variaciones en el tratamiento utilizado de inhibición de la proteína ERK, concluimos que esta inhibición sería suficiente en un estudio experimental como éste. Siendo ERK uno de los factores a incluir en un posible tratamiento frente al cáncer de próstata. Sin embargo, no se debe olvidar que el cáncer de próstata es una enfermedad heterogénea donde influyen múltiples factores a tener en cuenta para el abordaje de un posible tratamiento. Esto se confirma ante la observación de la cantidad de rutas metabólicas que confluyen en la activación de ERK (Cullen y Lockyer, 2002; Eisinger y Ammer, 2008; Gao y cols., 2010), así como la cantidad de factores que activa los factores de transcripción como c-myc, c-Fos y Elk-1 (Turjanski y cols., 2007); kinasas como MNK1, MNK2 entre otras (Zebisch y cols., 2007) o incluso proteínas pro y anti-apoptóticas como Bad, Bim o Bel-2 (Thakur y cols., 2009).

2.4 Expresión de c-myc

La implicación de myc en cáncer ha sido muy documentada. Su expresión o su mala regularización se estima que está presente en hasta un 70% de los cánceres humanos (Ribeiro y cols., 2007; Barros-Silva y cols., 2011; Zafarana y cols., 2012). Al estudiar la expresión de c-myc en las biopsias no se obtuvo un resultado concluyente. Al contrario, trabajos previos de Zafarana y cols. (2012) refieren el valor predictivo de c-myc en biopsias con aguja para pronóstico de recidiva tumoral después de la radioterapia. Sin embargo, no debemos olvidar que estas biopsias fueron tomadas antes del desarrollo del tumor.

En las muestras analizadas la expresión de c-myc en próstata normal fue negativa y en todas las muestras patológicas se expresó en el núcleo, incrementándose la expresión con la patología. Resultados similares fueron descritos por Koh y cols. (2010). Cuando se evaluó la frecuencia de expresión no hay diferencias significativas entre estroma y tumor. Se ha

observado sobreexpresión nuclear de Myc en adenocarcinoma primario de próstata asociándose con un evento crítico oncogénico que puede conducir a la iniciación del cáncer de próstata humano y su progresión (Gurel y cols., 2008).

Los tumores de próstata tempranos sobreexpresan Myc (Hawksworth y cols., 2010), pero rara vez tienen amplificaciones de Myc (Nupponen y cols., 1998; Edwards y cols., 2003). La amplificación se observa específicamente en tumores resistentes a castración (Kaltz-Wittmer y cols., 2000; Bernard y cols., 2003). Sin embargo, la amplificación génica de c-myc está ampliamente documentada en cánceres de mama, ovario, próstata, huesos y cerebro (Liao y Dickson, 2000; Darcy y cols., 2009; Fromont y cols., 2013). Y la elevada expresión de c-myc en cáncer de próstata primario predice recurrencia, enfermedad agresiva, mal pronóstico y enfermedad metastásica (Jenkins y cols., 1997; Sato y cols., 1999; Hawksworth y cols., 2010). También con frecuencia se sobre-expresa en PIN con un incremento escalonado de PIN de bajo grado a PIN de alto grado (Gurel y cols., 2008).

La sobreexpresión de Myc es suficiente para la inmortalización y transformación de las células epiteliales de próstata en humanos y por sí sola es capaz de promover la formación de tumores en experimentos de recombinación de tejidos (Gil y cols., 2005; Williams y cols., 2005).

Cuando se estudió la correlación de c-myc con los marcadores clásicos en las muestras de cáncer de próstata, solo se obtuvo una correlación inversa entre c-myc y la puntuación Gleason. Otros autores manifiestan que c-myc es capaz de predecir la progresión del cáncer de próstata. En pacientes con sobreexpresión de c-myc y menor expresión de p27, manifiestan tasas de recurrencia bioquímica significativamente más altas (Li y cols., 2013).

Además, la amplificación de c-myc se documenta como un medio para resistir la inhibición terapéutica de PI3K, que indica que c-myc está “*aguas abajo*” de PI3K para la tumorigénesis (Ilic y cols., 2011; Muellner y cols., 2011). Clegg y cols. (2011) a través del estudio de 194 tumores de próstatas, obtuvieron significancia estadística de co-ocurrencia de amplificación de Myc y alteración de la vía PI3K, planteando la posibilidad de que estas dos lesiones cooperan en la progresión del cáncer de próstata. Para investigar el potencial de interacción funcional entre Myc y PI3K utilizaron ratones transgénicos PTEN^{-/-}/Hi-MYC que confirmó un modelo previo de cooperatividad entre las dos vías (Kim y cols., 2009b). Además, los investigadores estudiaron por separado ratones que expresan solo Akt (modelo MPAKT) y ratones que solo expresan Myc (modelo Hi-MYC), sin embargo, el modelo bigénico (modelo MPAKT/Hi-MYC) demostró la progresión acelerada de neoplasia intraepitelial (MPIN) en el ratón. Ellos apuntaron que sus resultados tienen importancia para tratamientos de los cánceres humanos con alteraciones en la vía PI3K utilizando inhibidores de mTOR.

El aumento de c-myc combinado con la pérdida de PTEN aumenta aún más el valor predictivo de recidiva después de la radioterapia (Hoogland y cols., 2014). Mutaciones en PTEN pueden contribuir a la supresión de la cascada de Raf/MEK/ERK, debido a la

capacidad de los niveles elevados de Akt activados de fosforilar e inactivar Raf-1 (McCubrey y cols., 2006).

Muchos estudios se han centrado en la utilización terapéutica de myc para el cáncer, inhibiendo su expresión, interrumpiendo la dimerización Myc-Max, inhibiendo la unión ADN Myc-Max e interfiriendo los genes que son objetivos clave de myc (Dang, 2012).

2.5 Expresión de pRb, mp53 y Ki67

El porcentaje de muestras positivas para Rb fue del 50% en próstata normal. Este porcentaje aumenta en PIN, sin embargo, disminuye en HBP y cáncer. Cuando se evaluó la expresión de Rb, se observó que es mayor en epitelio glandular que en el estroma. No obstante, la frecuencia de muestras positivas es mayor para la intensidad baja y mayor en el estroma que en el tumor. Para pRb el porcentaje de muestras positivas es mayor que en Rb en todos los casos, aunque la expresión en el epitelio es mayor en Rb que en pRb. La frecuencia en pRb fue alta para los positivos altos y no hay diferencias significativas entre estroma y tumor. El aumento de las concentraciones de Rb se relaciona con disminución de la puntuación Gleason, mientras que pRb presentó una relación inversa con el estadio T clínico. Ioachim (2008) sugiere que pRb no tiene ningún valor pronóstico que permita predecir riesgo de recidiva y supervivencia global en carcinoma colorrectal. En cambio, la expresión de la proteína Rb en los ganglios linfáticos metastáticos representa un indicador pronóstico independiente en pacientes con metástasis cervical de tumor primario desconocido (Park y cols., 2013).

Herrera y cols. (1996) sugieren que la pérdida de función de la proteína (pRb) durante la tumorigénesis podría dar lugar a la falta de respuesta por parte de las células epiteliales a la inhibición por TGF-B. Egger y cols. (2016) demostraron, en cultivos de células de cáncer de mama altamente invasivas, que la fosforilación de Rb permitía la inhibición de la transición epitelial mesenquimal (EMT) disminuyendo la capacidad de invasión.

En nuestra investigación la expresión de mp53 aumentó con la patología, sin embargo, disminuye el número de muestras positivas. En la bibliografía encontramos resultados contradictorios, algunos autores señalan que el aumento de la expresión de p53 fue significativamente más alta en cáncer que HBP (Jiang y cols., 2005; Verma y cols., 2015). Por el contrario, otros investigadores ponen de manifiesto la falta de inmunoreactividad de p53 en la HBP (Sasor y cols., 2000; Petrescu y cols., 2006) En cáncer, Miyake y cols. (2010) plantean que la expresión de p53 se relaciona significativamente con varios factores pronósticos. Nosotros encontramos que la disminución de la expresión de p53 se correlacionó significativamente solo con el estadio T clínico. Vlachostergios y cols. (2012) han relacionado el aumento de la expresión y p53 con tiempos más cortos de progresión bioquímica. En otros estudios no encontraron relación entre p53 y los factores pronósticos clásicos (Zudaire Berguera y cols., 2000; Baseskioglu y cols., 2010; Makarewicz y cols., 2011) y sugieren que las mutaciones en el gen supresor tumoral p53 no influyen en el grado de diferenciación o en el estadio clínico del cáncer de próstata (Makarewicz y cols., 2011).

Al contrario, estudios previos señalaban que la expresión de p53 anormal en el cáncer de próstata se relaciona con mayor riesgo de muerte específica de la enfermedad, así como el desarrollo de metástasis a distancia a los 5 años (Che y cols., 2007).

En modelos de ratón transgénicos de cáncer de próstata realizando una ablación condicional de uno o dos alelos de p53 y/o PTEN han revelado que la ablación p53^{+/-} o p53^{-/-} no desarrollaron lesiones de PIN o cáncer de próstata. Mientras que ablaciones de 50% doble mutantes PTEN^{-/-}p53^{-/-} exhibieron cáncer de próstata invasivo a las 10 semanas de edad (Elgavish y cols., 2004; Chen y cols., 2005; Abou-Kheir y cols., 2010). Se ha observado que los ratones transgénicos p53^{-/-}Rb^{-/-} desarrollan tumores de crecimiento rápido con metástasis en los ganglios linfáticos regionales, pulmones, hígado y glándulas suprarrenales (Zhou y cols., 2006). Se piensa que estas mutaciones cooperan con la progresión del cáncer de próstata invasivo y metastásico mediante la superación de la senescencia celular y la muerte apoptótica de las células madre/progenitoras del cáncer de próstata y sus progenies como se observa con frecuencia en los cánceres de próstata humanos (Mimeault y Batra, 2011).

Sauer y cols. (2010) demostraron en líneas celulares de próstata que la mutación de p53 promueve la progresión del cáncer a través de la regulación en alza del factor de transcripción Egr-1. Erg-1 es un factor de transcripción de respuesta temprana inducida por una amplia gama de factores de crecimiento y señales de estrés. Esta sobreexpresión de Erg-1 lleva a la activación autocrina de EGFR, así como aumento en la secreción de citoquinas que promueven el cáncer, tales como TGF- β (Sauer y cols., 2010). Todo este proceso parece ser iniciado a través de la cascada de señalización de MEK/ERK1/2 por mutación de p53. Se ha descrito que Akt media la desestabilización de p53, contribuyendo a la progresión del cáncer al incrementar la proliferación celular (Ogawara y cols., 2002; Hamilton y cols., 2014).

El supresor de tumores p53 y el factor Bcl-2 participan activamente en la regulación del crecimiento celular y la apoptosis. Recurrencia basada en el PSA se asoció con la expresión aumentada de p53 y Bcl-2 en pacientes que se habían sometido a prostatectomía radical (Bauer y cols., 1996).

Cuando evaluamos las biopsias no encontramos resultados concluyentes para Ki67. Ojea-Calvo y cols. (2004) obtienen resultados semejantes. En las muestras normales y patológicas de este estudio, la expresión de Ki67 se observó solo en el núcleo, siendo casi negativa en cáncer y el porcentaje de muestras positivas aumentó con la malignidad. No hay diferencias significativas de la frecuencia entre estroma y tumor. Trabajos precedentes coinciden al no encontrar asociación significativa entre cáncer de próstata y alta expresión de Ki67 en prostatectomía radical (Vis y cols., 2002; Wolters y cols., 2010; Baseskioglu y cols., 2010). Por otro lado, Richardsen y cols. (2010) estudiaron muestras de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata con metástasis y pacientes sin evidencia clínica, bioquímica o radiológica de metástasis dentro de los 10 años después del diagnóstico.

Encontraron alta expresión de TGF-B y Ki67 en las muestras de carcinoma de próstata metastásico, en comparación con las muestras de cáncer prostático no metastásico.

En el análisis de Spearman, Ki67 en nuestra cohorte de pacientes, presentó correlación inversa significativa con el PSA. En trabajos previos, Ki67 ha sido correlacionada como marcador independiente de riesgo de metástasis, progresión y muerte (Pollack y cols., 2004; Khor y cols., 2009). En cáncer de mama el porcentaje de expresión del Ki67 presentó una relación significativa con el grado histológico, el tamaño del tumor y los receptores hormonales (Panal y cols., 2014). En otras investigaciones, Ki67 se ha asociado significativamente con progresión bioquímica, supervivencia libre de progresión bioquímica y puntuación de Gleason alta (Zudaire Bergera y cols., 2000; Laitinen y cols., 2008; Fisher y cols., 2013). Tollefson y cols. (2014) añaden que la combinación de puntuación Gleason, invasión perineural y expresión de Ki67 estiman mejor la progresión y muerte en cáncer de próstata.

2.6 Expresión de IAPs

En este estudio el porcentaje de muestras positivas de IAP1/2 y c-IAP-2 disminuye con la patología. En ambas, IAP1/2 y c-IAP-2, se expresó en el núcleo de PN, HBP y PIN, en las muestras de cáncer en el núcleo y citoplasma. La frecuencia de positividad fue mayor para IAP1/2 sin observarse diferencias significativas entre estroma y tumor. En ambos casos, IAP1/2 y c-IAP-2, los más frecuentes fueron los positivos altos.

La elevada expresión de c-IAP-2 se correlaciona con progresión del tumor, mal pronóstico, baja respuesta al tratamiento, metástasis o pobre supervivencia (Krajewska y cols., 2005; Dubrez y cols., 2013). Las alteraciones en la expresión de IAP y caspasas contribuyen al comportamiento maligno de tumores de próstata (Rodríguez-Berriguete y cols., 2015). En los resultados de este trabajo la expresión de IAP 1/2 se relacionó con el estadio T patológico, sin embargo, c-IAP-2 solo de manera inversa con la supervivencia.

3 Expresión proteica de los componentes de la vía de transducción TGF-B/PI3K/Akt y su implicación en la próstata normal y la patología prostática

3.1 Expresión de TGF-B y sus receptores

En este trabajo, el receptor de TGF-B, TGFBR2, se expresó en próstata normal. No hubo expresión de TGF-B ni de TGFBR1 en las próstatas no patológicas. La expresión en el estroma de TGF-B y de TGFBR1 se correlacionó con la progresión bioquímica, de forma directa TGFBR1 e indirectamente TGF-B. TGF-B y su receptor TGFBR2 se relacionaron negativamente con la supervivencia. Además, TGFBR1 presentó una relación directa con el estadio T clínico. Previamente, otros autores describieron un aumento en la expresión de

TGF-B y sus receptores en el cáncer de próstata o en los tejidos adyacentes en comparación con los pacientes sin patología (Royuela y cols., 1998; Shariat y cols., 2004). Royuela y cols. (1998) añaden que TGF-B es capaz de inhibir el crecimiento y proliferación celular e induce apoptosis. A la misma conclusión llega Salm y cols., (2012).

Resultados discrepantes se encuentran en la bibliografía con respecto a la asociación de TGF-B y sus receptores con el cáncer. Wang y cols. (2016) midieron los niveles de TGF-B1 en plasma preoperatorio y lo asociaron con progresión bioquímica después de la crioblación en un paciente con cáncer de próstata localizado. Katta y cols. (2003), asociaron valores séricos preoperatorios de TGF-B1 con recidivas bioquímicas en pacientes sometidos a prostatectomía. Tas y cols. (2015) señalan que valores elevados de TGF-B estaban presentes en pacientes que respondían a tratamiento con quimioterapia y tenían una supervivencia favorable en comparación con los que tenían valores más bajos en cáncer gástrico. La relación de niveles elevados de TGF-B asociado a diagnóstico favorable también ha sido descrito en cáncer de mama (Ciftci y col., 2014). Aumento de la TGF-B1 en plasma post-operatorio puede ser un nuevo predictor de resultados oncológicos pobres y agresivo en cáncer de próstata (Wang y cols., 2016).

Shariat y cols. (2008) propusieron que la pérdida de expresión de TGFBR1 podría servir como marcador pronóstico en pacientes con cáncer de próstata. Reis y cols. (2011) relacionaron el incremento en la expresión de TGF-B1 con altas puntuaciones de Gleason. Wu y cols. (2015) describen que las alteraciones de la expresión de TGF-B1 afecta la invasividad del tumor, crecimiento y reclutamiento celular. Estos mismos autores concluyen que TGF-B1 puede ser un marcador pronóstico útil para el cáncer de próstata. Aunque no se ha observado en este trabajo una correlación significativa con la puntuación Gleason, se sugiere que el TGF-B podría ser un factor determinante en la progresión y pronóstico del cáncer de próstata ya que se correlaciona inversamente con la progresión bioquímica y la supervivencia.

La posibilidad de utilizar TGF-B como biomarcador para el cáncer de próstata ha sido discutido anteriormente (Thompson y cols., 1992). Los niveles en suero se correlacionan con la carga tumoral, metástasis y PSA sérico (Korrodi-Gregório y cols., 2014). El estadio del tumor se ha relacionado con la presencia de TGF-B en el semen (Wikström y cols., 2001). Aunque hay que aclarar que estos niveles elevados de TGF-B también se han encontrado en pacientes con mieloma y varios tipos de linfomas (Urashima y cols., 1996; Teicher, 2007).

Por otro lado, TGF-B y EGF pueden inducir la disminución de HLA permitiendo así la transición epitelio mesénquimal (EMT) en células de cáncer de próstata (Chen y cols., 2015b). Regulación a la baja de HLA-I (Human leukocyte antigen) se observa en cánceres de próstata primarios y metastásicos. Estudios precedentes como los de Ding y cols. (2011) planteaban que TGF-B en las últimas etapas del cáncer promueve el fenotipo metastásico a través de la transición epitelio mesenquimal. El hecho de que TGFBR1 y TGFBR2 están

disminuidos en la metástasis en comparación con los tumores primarios, puede indicar un papel activo de esta alteración en la progresión del cáncer (Guo y cols., 1997). Un efector clave en la ruta de TGF- β es SMAD4, que induce senescencia celular para frenar la progresión del tumor. La eliminación genética de SMAD4 conduce al desarrollo de tumores altamente invasivos y metastásicos con alta penetrancia (Ding y cols., 2011; Shtivelman y cols., 2014). La pérdida de expresión de SMAD4 ha sido estudiada en cáncer de próstata asociándose con alto grado Gleason (Ding y cols., 2011).

3.2 Expresión PI3K/Akt/mTOR

En los resultados de este estudio, la positividad de la expresión de PI3K disminuyó con la patología expresándose en el epitelio glandular. Al evaluar la frecuencia de los positivos no se observaron diferencias notorias entre estroma y tumor, siendo mayores los porcentajes de los positivos altos. La señalización de PI3K se relaciona de manera inversa con los márgenes, supervivencia y progresión bioquímica. En trabajos previos, la señalización aberrante de la vía PI3K estaba fuertemente asociada con peor pronóstico en muchos tipos de tumores incluyendo el cáncer de próstata (Saal y cols., 2007). Se ha relacionado el aumento de expresión de PI3Kp110 (unidad catalítica) en cáncer de próstata con disminución del tiempo de recaída bioquímica (McCall y cols., 2008). Sin embargo, la relación con la expresión de PI3Kp85 (unidad reguladora) no ha sido descrita anteriormente en cáncer de próstata. En cáncer de mama, el aumento de la expresión de PI3Kp85 se relacionó con el grado tumoral, invasión vascular y recurrencia (Zhou y cols., 2014). Resultados similares fueron obtenidos por Elfiky y cols. (2011) en cáncer renal. El aumento de la activación de PI3K se asoció significativamente con disminución de la apoptosis (Andersen y cols., 2010). Con los datos obtenidos y descritos anteriormente, podríamos proponer a PI3K como marcador pronóstico del cáncer de próstata por su relación negativa con los márgenes quirúrgicos, progresión bioquímica y la supervivencia.

En esta investigación, el porcentaje de expresión en el núcleo de las células epiteliales prostáticas de p-Akt-Ser y p-Akt-Thr fue igual en las próstatas normales y patológicas. La frecuencia p-Akt-Ser es levemente mayor en el tumor a expensas de los positivos altos. Resultados similares han sido reportados por Ayala y cols. (2004). Por otro lado, la frecuencia de p-Akt-Thr es igual en estroma y tumor siendo mayor en los positivos altos. P-Akt-Ser no se relacionó con ningún marcador clásico estudiado. En trabajos previos, se encuentran resultados discordantes. El incremento de la expresión de Akt-Ser activado se correlaciona con un mayor grado Gleason (Malik y cols., 2002), progresión tumoral (Kinkade y cols., 2008), supervivencia y recurrencia (Ayala y cols., 2004). También, p-Akt-Ser se ha descrito como un predictor independiente solo o combinado con PTEN (Ayala y cols., 2004; Bedolla y cols., 2007). Kreisberg y cols. (2004) detallan la falta de relación de Akt-Ser con la progresión bioquímica aún cuando sí encuentran relación con el pronóstico clínico. La sobreexpresión de Akt se asocia con la invasión de los ganglios linfáticos en el carcinoma no microcítico avanzado de pulmón (Jiang y cols., 2014). En el

cáncer de mama, Okutur y cols. (2015) hallaron asociación significativa con la progresión bioquímica o la supervivencia.

La expresión de Akt-Thr fosforilado en el estroma y tumor se asoció con una disminución significativa en la invasión perineural. No se observó relación de p-Akt-Thr con la progresión bioquímica. Al-Saad y cols. (2009) al explorar en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), señalan que la expresión en células epiteliales tumorales de p-Akt-Thr fue un indicador pronóstico positivo para la supervivencia específica de la enfermedad. Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* por Barber y cols. (2015) encontraron que la activación de Akt conduce a una reducción significativa en expresión de E-cadherina. En este mismo estudio la disminución de la E-cadherina fue significativamente asociada con una disminución de recurrencia bioquímica en pacientes con cáncer de próstata, lo que sugiere que altos niveles de PI3K/Akt reducen la expresión de E-cadherina, favoreciendo la tumorigénesis y el desarrollo de metástasis (Barber y cols., 2015; Yan y cols., 2016).

Se ha demostrado que Akt es un regulador positivo de la expresión de survivina en las células endoteliales, y estudios previos han afirmado que la vía de señalización de PI3K/Akt/survivina es una vía anti-apoptótica en el cáncer de próstata, cáncer de pulmón, mieloma y leucemia (Tang y cols., 2009; Guha y Altieri, 2009). Hamilton y cols. (2014) demostraron que la inhibición en conjunto de PI3K/Akt pueden ser eficaces en tumores resistentes a tratamiento con elevadas concentraciones de Akt y mutaciones de p53.

En esta investigación, los porcentajes de positividad son altos en mTOR y en su forma activada, y levemente mayor en el epitelio que en el estroma en mTOR y p-mTOR. En el caso de la frecuencia fue similar en el estroma y tumor a expensas de los positivos altos en mTOR y p-mTOR. Resultados similares fueron obtenidos en trabajos previos (Facompre y cols., 2012; Ko y cols., 2014). Brown y cols. (2008) utilizaron microarrays de tejido, y también consiguieron resultados como los aquí presentados. Sutherland y cols. (2014) obtuvieron diferencias significativas entre muestras de próstata normal y PIN. En el análisis de correlación de Sperm mTOR y p-mTOR presentaron una relación inversa significativa con el estadio T clínico. Sin embargo, solo p-mTOR se relacionó además con estadio T patológico e implicación de ganglios. Ko y cols. (2014) no encontraron ninguna relación entre mTOR y su forma fosforilada con los marcadores clásicos. Sutherland y cols. (2014) hallaron una tendencia entre la expresión alta de p-mTOR y peor pronóstico, sin ser estadísticamente significativa.

Recientemente se ha estudiado el papel regulador que desempeña mTOR en la motilidad de células tumorales, invasión y metástasis del cáncer. Chen y cols. (2015a) al inhibir mTORC1 o mTORC2 describen una relación entre aumentos de la expresión de Raptor y Rictor en tejidos de cáncer de próstata con progresión y metástasis. Además, observaron modificaciones de los niveles de expresión de diversos marcadores de transición epitelio mesenquimal como consecuencia de la regulación a la baja de proteínas reguladoras cruciales en la migración celular y la invasión (RhoA y Rac1). Dan y cols. (2008)

defienden que en cáncer de próstata deficiente de PTEN la promoción de la actividad de NF-KB está mediada por Akt a través de mTORC1. La pérdida de PTEN provoca la activación constitutiva de Akt y es insensible a la regulación de retroalimentación por mTORC1 (Dan y cols., 2008).

Laberge y cols. (2015) utilizando rampamicina, lograron en próstata de ratones la supresión de la inflamación asociada a la senescencia, evitando así el crecimiento del tumor. Sin embargo, Stello y cols. (2016) describen que la vía de mTOR se activa específicamente en pacientes con cáncer de próstata favorable y añade que por esta razón los inhibidores de mTOR resultaron infructuosos en el ensayo de cáncer de próstata.

Un enfoque combinado hacia el bloqueo de múltiples vías de señalización mal reguladas en el cáncer de próstata ha demostrado ser una estrategia efectiva para reducir la carga tumoral en un entorno preclínico utilizando inhibidores de MEK y rampamicina (inhibidor de mTOR) en ratones transgénicos (Kinkade y cols., 2008). Estudios clínicos sugieren que la combinación de inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTOR con radioterapia, es una modalidad prometedora para el tratamiento de cáncer de próstata radio-resistentes (Chang y cols., 2014).

Se ha observado que Mcl-1 está altamente expresado en procesos patológicos tanto benignos (HBP) como PIN y cáncer. Esto concuerda con los datos bibliográficos encontrados tanto para cáncer de próstata (Royuela y cols., 2001), como en otros cánceres, como mama (Ding y cols., 2007) o tiroides (Maia y cols., 2016). Además, se ha relacionado como un factor de crecimiento y supervivencia crítico para las células tumorales de cánceres de mama y pulmón (Ramirez-García, 2014). Al igual que ocurría con Bcl-xL, se ha postulado su participación en la supresión del efecto pro-apoptótico de la proteína Bim mediante su unión directa en casos de cáncer de próstata, lo cual encaja con los resultados obtenidos y la explicación de porqué pese a los altos niveles de Bim observados, no se detecta un efecto pro-apoptótico de la misma (Gogada y cols, 2013). Mcl-1 presentó una relación negativa con el PSA. En tumores de mama el aumento de la expresión de Mcl-1 se correlaciona con alto grado tumoral y pobre supervivencia (Booy y cols., 2011).

3.3 Expresión de Ikk/IkB

En este estudio, el porcentaje de pacientes positivos de Ikk disminuye con la patología prostática siendo menor en PIN y cáncer. Estos resultados también fueron observados en las biopsias. La densidad óptica es mayor en cáncer y mayor en el epitelio glandular que en el estroma. La disminución de la expresión de Ikk podría indicar el inicio en la patogénesis del cáncer de próstata en etapas más tempranas, pues el cambio se observa en PIN. Al evaluar la expresión de p-Ikk el porcentaje de muestras positivas aumenta con la patología y sin diferencia significativa en PIN y cáncer. En las biopsias, la expresión de p-Ikk arrojó los mismos resultados. Esto podría indicar que las alteraciones de Ikk y su forma activa son específicas del proceso maligno. La disminución de la intensidad de la expresión de Ikk se

correlacionó significativamente con el estadio T patológico. Sin embargo su forma activada no se relacionó con ninguno de los marcadores clínicos patológicos estudiados.

Numerosos estudios relacionan Ikk y su diana NF-kB con enfermedades inflamatorias y su hipotético papel como promotor de tumor en un ambiente de inflamación crónica. Huang y cols. (2014) señalan que enfermedades como la enfermedad de Hodgkin, carcinoma hepatocelular asociado a hepatitis, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria del intestino, están relacionadas con Ikk y NF-kB. La inhibición de Ikk puede representar una estrategia para combatir el cáncer de próstata en etapa tardía, al menos en parte, mediante la regulación del ambiente inflamatorio, mientras IkkB puede ser más relevantes para las etapas tempranas de la enfermedad (Gamble y cols., 2012). Otros autores han sido más específicos en señalar que la quinasa Ikk α es un regulador clave de la oncogénesis y conductor del proceso metastásico (Affara y Coussens, 2007; Luo y cols., 2007). El mecanismo por el cual Ikk α afecta la progresión del cáncer aún no está completamente claro (Leopizz y cols., 2017). Algunos investigadores indican que en muchos cánceres incluyendo el cáncer de próstata, la señalización Ikk/NF-kB podría estar alterada o activa debido a la alteración de otras vías oncogénicas como Akt o por la pérdida de la función supresora de tumores PTEN (Nguyen y cols., 2014; Jain y cols., 2012).

El mayor porcentaje de muestras positivas para IkB y p-IkB fue en HBP, sin embargo la densidad óptica fue mayor en cáncer y en el epitelio glandular en ambos casos. Al evaluar la correlación p-IkB se observó una relación directa con la implicación de ganglios. En vista de estos resultados parece que la expresión de IkB y su forma fosforilada no es específica de los procesos malignos, pero sí de los procesos inflamatorios.

3.4 Expresión de p21/p27

El porcentaje de positividad de p21 en HBP y PIN ha sido del 100%; disminuye en las muestras con cáncer de próstata. La expresión para p21 fue más elevada en el citoplasma que en el núcleo en PIN, HBP y cáncer. En trabajos previos describen ausencia de inmunoreactividad para p21 en próstata normal (Aaltomaa y cols., 1999; Royuela y cols., 2001). Incrementos de la expresión de p21 se relaciona significativamente con disminución de la supervivencia. La expresión de p21 ha sido estudiada ampliamente, sin embargo los resultados son discordantes. En estudios previos la sobreexpresión de p21 se ha asociado con un mayor grado de Gleason, mala supervivencia y aumento de cáncer de próstata recurrente (Jain y cols., 2013). Por el contrario, en un número importante de muestras, señalan que los aumentos de los niveles de p21 solo se han asociado con un mayor riesgo de recidiva del PSA (Lacombe y cols., 2001). Wu y cols. (2007) señalaban que p21 no tenía ningún papel en la predicción de recaída bioquímica. Jain y cols. (2013) estudiando un modelo de ratón transgénico demuestran que la delección de p21 reduce la tumorigénesis de próstata y que la sobreexpresión de p21 se asocia con cáncer de próstata agresivo, posiblemente mediado por la capacidad de p21 para inhibir la apoptosis (Fizazi y cols.,

2002; Tran y cols., 2012). La expresión de p21 también ha sido estudiada en pacientes sometidos a radioterapia post-prostatectomía (RTa) y en pacientes que reciben radioterapia cuando ocurre la recidiva bioquímica (RTs). Al evaluar el pronóstico entre los grupos encontraron que p21 solo podría ayudar a predecir la probabilidad de respuesta a la radioterapia de rescate (Rigaud y cols., 2004).

En cánceres de próstata resistentes a castración, la expresión de p21 se asocia con la progresión a cáncer. Posiblemente por un efecto paracrino de p21 mediada por la liberación de factores mitogénicos y anti-apoptóticos. Otra explicación consiste en que la regulación de la expresión de p21 esta mediada por los receptor de andrógenos (Fizazi y cols., 2002).

La proteína CDKI p27 no se expresó en próstata normal ni en las biopsias. El porcentaje de muestras positivas fue mayor en HBP, disminuye en PIN y cáncer. La diferencia de la expresión entre citoplasma y núcleo no es significativa en la patología prostática. La expresión de p27 en estroma y tumor es mayor en los positivos bajos. Hubo una correlación directa de p27 con el estadio T clínico. Vis y cols. (2002) mostraron que cuando la expresión es menor del 50% para p27 junto con puntuación Gleason era suficiente para predecir la enfermedad clínicamente significativa. p27 es un supresor de tumor y se ha observado que la pérdida parcial de la función p27 es más oncogénico que la pérdida completa, aunque los mecanismos de éste siguen sin estar claros (Zhao y cols., 2014). Del mismo modo, la acumulación citoplasmática de p21 y p27 se correlaciona con agresividad tumoral, metástasis y mal pronóstico en muchos tipos de cánceres (Besson y cols., 2008; Abukhdeir y Park, 2008; Guo y cols., 2010).

La localización citoplasmática de p27 se ha detectado en muchos cánceres humanos, incluyendo melanoma, carcinoma de ovario, carcinoma de células renales, osteosarcoma, leucemia mielógena aguda y cáncer de mama (Zhao y cols., 2014). Está generalmente asociado con un mal pronóstico, alto grado tumoral y metástasis (Thomas y cols., 2000; Denicourt y cols., 2007; Chen y cols., 2011). El efecto tumorigénico de p27 citoplasmática podría estar mediado por una supresión de la apoptosis, que puede causar aumento de la resistencia a las terapias anti-tumorales que inducen la muerte de células cancerosas en cáncer de mama (Zhao y cols., 2014). La localización citoplasmática de p27 sugiere una posible aplicación como marcador pronóstico clínico (Zhao y cols., 2014).

La mala regulación de los niveles de proteína p27 puede ser un evento temprano crítico en el desarrollo de neoplasia prostática (De Marzo y cols., 1998c). Además, la pérdida de expresión sola o combinada de PTEN/p27 se asocia con parámetros patológicos adversos, proliferación de células tumorales y mayor riesgo de recurrencia en cáncer de próstata (Halvorsen y cols., 2003; Hoogland y cols., 2014).

4 Capacidad pronóstica para recurrencia bioquímica, de los componentes de las rutas de transducción estudiadas en asociación con los marcadores clásicos.

En el presente trabajo se evalúa cuáles de los marcadores clásicos que tenían más influencia sobre la progresión bioquímica, obteniendo como resultados, según el método estadístico utilizado: estadio T patológico, puntuación Gleason e implicación de ganglios. Factores como PSA preoperatorio, estadio T clínico, invasión perineural, márgenes quirúrgicos no presentaron ninguna orientación relacionada con la recurrencia bioquímica en esta cohorte. Estudios previos de este grupo de investigación apoyan estos resultados (Cansino y cols., 2009, 2011; Rodríguez-Berriguete y cols., 2015; Torrealba y cols., 2016). Resultados controvertidos como los de Aguilera y cols. (2015) que concluyen que el factor que más influye en la recurrencia bioquímica es la presencia de márgenes quirúrgicos positivos y puntuación Gleason. Shahabi y cols. (2016) son más específicos, y apuntan que los predictores de recurrencia bioquímica después de los 2,9 años, son Gleason score 7 (4 + 3), PSA preoperatorio, y estadio \geq pT3a.

4.1. IL-1a e IL-1Ra como marcador pronóstico de recidiva bioquímica

La IL-1a como miembro de la familia de IL-1 se ha estudiado ampliamente en numerosos tipos de cáncer, pero poco se ha investigado sobre su asociación con los marcadores clásicos y su valor pronóstico en cáncer de próstata. Tanto IL-1a como su receptor antagonista se expresan en tejidos de cáncer de próstata, pero no en tejido de próstata normales. Además, ambos tenían la capacidad de relacionarse con más de un marcador clínico-patológico. Los pacientes con expresión positiva en el estroma y en el tumor de IL-1a tuvieron tiempos de progresión bioquímica más largos que los negativos. Cuando se evaluó la capacidad pronóstica de la IL-1a se observó que se mantiene como factor pronóstico independiente después del ajuste del estadio T patológico, puntuación Gleason e implicación de ganglios. Por otro lado, la expresión positiva del receptor antagonista, IL-1Ra, demostró tener tiempos de progresión bioquímica más cortos que los negativos. Y dentro del grupo de positivos, los positivos bajos presentaron tiempos más cortos que los positivos altos. La capacidad pronóstica independiente de IL-1Ra se conserva tras el ajuste con estadio T patológico y puntuación Gleason.

4.2. p38 como marcador pronóstico de recidiva bioquímica

La proteína p38 ha sido estudiada en diferentes tipos de patologías incluyendo el cáncer de próstata. La asociación de p38 con marcadores clásicos y valor pronóstico en cáncer de próstata no se ha investigado con anterioridad. En el actual estudio, la expresión de p38 aumenta en la patología prostática. Aumentos de la expresión de p38 obtuvo asociación inversa con puntuación Gleason, implicación de ganglios y progresión bioquímica. Los pacientes negativos para p38 tuvieron tiempos de progresión bioquímica más cortos que los

positivos. Tras el ajuste con estadio T patológico, puntuación Gleason e implicación de ganglios p38 mantiene su valor pronóstico independiente de recidiva bioquímica.

4.3. TGF-B como marcador pronóstico de recidiva bioquímica

En esta investigación, no se observó expresión de TGF-B y TGFBR1 en próstata normal, no obstante, sí tuvo expresión en las muestras con patología prostática. TGF-B se relaciona con la supervivencia y su receptor RI con estadio T clínico. Además, la expresión de ambos presentó asociación con la progresión bioquímica, de manera inversa con TGF-B y directa con el receptor TGFRI. El tiempo de progresión bioquímica fue más corto para los pacientes que carecían de la expresión de TGF-B. Por el contrario, los pacientes sin expresión de TGFRI duplicaban los tiempos de progresión bioquímica. Entre el grupo de positivos para TGFRI, los pacientes con expresión baja presentaron tiempos de progresión bioquímica más largos que los positivos bajos. Asimismo, TGF-B y TGFRI mantuvieron su rol de marcador pronóstico independiente para recidivas bioquímicas, después del ajuste con el estadio T patológico, puntuación Gleason e implicación de ganglios.

4.4. PI3K como marcador pronóstico de recidiva bioquímica

La expresión de PI3K y su relación con los marcadores clásicos no ha sido estudiada previamente en cáncer de próstata. En el presente trabajo, la expresión de PI3K fue positiva tanto en próstata normal como en la patológica, aunque disminuyó con la patología. La positividad de PI3K se caracterizó por presentar una asociación negativa con márgenes quirúrgicos, progresión bioquímica y supervivencia. La expresión negativa de PI3K tuvo tiempos de progresión bioquímica más cortos que los pacientes positivos. El análisis de supervivencia Kaplan-Meier y Cox unifactorial confirmó los resultados obtenidos en el test de Spearman que relacionó la expresión de PI3K con progresión bioquímica. Cuando realizamos el ajuste, la expresión de PI3K prevaleció como valor pronóstico con el estadio T patológico, puntuación Gleason e implicación de ganglios. Estudios previos en cáncer renal señalan a PI3K como marcador pronóstico independiente (Elfiky y cols., 2011).

V Conclusiones

1. Las citoquinas pro-inflamatorias IL-1a, IL-6 y sus receptores aumentaron su expresión en patología prostática (HBP, PIN y cáncer) pudiéndose relacionar con proliferación celular.
2. El estudio de la inmunexpresión de las diferentes proteínas de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 Bax, Bak, Bad, Bim, Nova y Puma) denota diferencias significativas entre los grupos de estudio. Bcl-2, Bcl-xL, Bax y Nova tuvieron algún tipo de relación con los marcadores clásicos.
3. Algunas MAPKs (ERK-1, ERK-2, p-ERK, p38), MAPKKs (MEK-1, p-MEK, MEK-6) y MAPKKK (Raf-1) se encuentran sobre expresadas en los tumores prostáticos, lo cual nos sugiere que podrían estar involucradas en la patología prostática.
4. Proteínas como Rb, mp53, p21 y p27, que intervienen en el ciclo celular, incrementaron su expresión en HBP, PIN y cáncer. La sobreexpresión de estas proteínas podrían ser un marcador temprano de patología prostática.
5. Los factores de transducción estudiados NF-kB p50, p-ATF-2, p-Elk-1 y AP-1 se asocian con características clínico patológicas adversas de cáncer de próstata y podrían estar relacionados con el aumento de la malignidad, a excepción de Ap-1 cuya sobreexpresión podría ser insuficiente para frenar el exceso de proliferación.
6. EGF y su receptor tienen una acción determinante en el desarrollo de la patología prostática. Además podrían estar asociados con la malignidad. EGF podría actuar de manera similar a los andrógenos en las células de cáncer de próstata, actuando sobre la fase G₀/G₁. Este suceso podría provocar una transición hacia la fase S y en consecuencia, producir proliferación celular.
7. TGF-B tiene un efecto proliferativo en las líneas células LNCaP y PC-3. Este efecto es inhibido por p38 MAPK en las células LNCaP no así en las PC3. p38 MAPK podría ser un buen inhibidor de proliferación celular y debería tenerse en cuenta en el diseño de un posible tratamiento frente al cáncer de próstata.
8. Los pacientes negativos para IL-1a, p38, TGF-B y PI3K en las células cancerosas prostáticas, presentan un pronóstico adverso para progresión bioquímica tras prostatectomía radical.
9. IL-1a, IL-1Ra, p38, TGF-B, TGFBR1 y PI3K podrían ser útiles como marcadores pronósticos independientes y complementarios para recurrencia bioquímica tras prostatectomía radical.

VI Bibliografía

- Aaltomaa, S., Lipponen, P., Eskelinen, M., Ala-Opas, M., Kosma, V.M. (1999). Prognostic value and expression of p21 (waf1/cip1) protein in prostate cancer. *Prostate*. 39(1):8-15.
- Abbas, T., Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 9(6):400-14.
- Abbas, T., Jha, S., Sherman, N.E., Dutta, A. (2007). Autocatalytic phosphorylation of CDK2 at the activating Thr160. *Cell Cycle*. 6(7):843-52.
- Abrahamsson, P.A. (1999). Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Prostate*. 39, 135-148.
- Abou-Kheir, W.G., Hynes, P.G., Martin, P.L., Pierce, R., Kelly, K. (2010). Characterizing the contribution of stem/progenitor cells to tumorigenesis in the Pten^{-/-}-TP53^{-/-} prostate cancer model. *Stem Cells*. 28(12):2129-40.
- Abukhdeir, A.M., Park, B.H. (2008). P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med*. 10():e19.
- Adams, J.M., Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 26(9):1324-37.
- Adhyam, M., Gupta, A.K. (2012). A Review on the Clinical Utility of PSA in Cancer Prostate Indian. *J Surg Oncol* 3(2): 120–129.
- Affara, N.I., Coussens, L.M. (2007). IKK α at the crossroads of inflammation and metastasis. *Cell*. 129(1):25-6.
- Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 3(9):745-56.
- Aguilera, A., Bañuelos, B., Díez, J., Alonso-Dorrego, J.M., Cisneros, J., Peña, J. (2015). Biochemical recurrence risk factors in surgically treated high and very high-risk prostate tumors. *Cent European J Urol*. 68(3):302-7.
- Akinleye, A., Avvaru, P., Furqan, M., Song, Y., Liu, D. (2013a). Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics *J Hematol Oncol* 6: 88.
- Akinleye, A., Furqan, M., Mukhi, N., Ravella, P., Liu, D. (2013b). MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *J Hematol Oncol*. 6:27.
- Alcover, J., Filella, X., Luqué, P., Molina, R., Izquierdo, L., Augé, J.M., Alcaraz, A. (2010). Prognostic value of IL-6 in localized prostatic cancer. *Anticancer Res*. 30(10):4369-72.

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

Al-Saad, S., Donnem, T., Al-Shibli, K., Persson, M., Bremnes, R.M., Busund, L.T. (2009). Diverse prognostic roles of Akt isoforms, PTEN and PI3K in tumor epithelial cells and stromal compartment in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 29(10):4175-83

Amitghofran, Z., Monabati, A., Gholijani, N. (2005). Apoptosis in prostate cancer: Bax correlation with stage. *Int J Urol.* 12:340-345.

Amorino, G.P., Parsons, S.J. (2004). Neuroendocrine cells in prostate cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 14, 287-300.

Ananth, S., Knebelmann, B., Grüning, W., Dhanabal, M., Walz, G., Stillman, I.E., Sukhatme, V.P. (1999). Transforming growth factor beta1 is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor and a critical growth factor for clear cell renal carcinoma. *Cancer Res.* 59(9):2210-6.

Andersen, J.N., Sathyanarayanan, S., Di Bacco, A., Chi, A., Zhang, T., Chen, A.H., Dolinski, B., Kraus, M., Roberts, B., Arthur, W., Klinghoffer, R.A., Gargano, D., Li, L., Feldman, I., Lynch, B., Rush, J., Hendrickson, R.C., Blume-Jensen, P., Paweletz, C.P. (2010). Pathway-based identification of biomarkers for targeted therapeutics: personalized oncology with PI3K pathway inhibitors. *Sci Transl Med.* 2(43):43ra55.

Andrew, A., Kramer, B., Rawdon, B.B. (1998). The origin of gut and pancreatic neuroendocrine (APUD) cells--the last word? *J Pathol* 186, 117-118.

Andrews, G. (1951). The histology of the human foetal and prepu-bertal prostates. *J. Anat.* 85, 44-54.

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P., Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell.* 49:729-739.

Angel, P., Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochem Biophys Acta.* 1072:129-157.

Annes, J.P., Munger, J.S., Rifkin, D.B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.* 116(Pt 2):217-24.

Anvari, K., Seilanian Toussi, M., Kalantari, M., Naseri, S., Karimi Shahri, M., Ahmadnia, H., Katebi, M., Sedighi Pashaki, A., Dayani, M., Broumand, M. (2012). Expression of Bcl-2 and Bax in advanced or metastatic prostate carcinoma. *Urol J.* 9(1):381-8.

Aprikian, A.G., Cordon-Cardo, C., Fair, W.R. y Reuter, V.E. (1993). Characterization of neuroendocrine differentiation in human benign prostate and prostatic adenocarcinoma. *Cancer* 71, 3952-3965.

Apte, R.N., Voronov, E. (2008). Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? *Immunol Rev.* 222:222-41.

Ashkenazi, A. (2008). Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nat Rev Drug Discov.* 7(12):1001-12.

Aumuller, G., Leonhardt, M., Janssen, M., Konrad, L., Bjartell, A. y Abrahamsson, P.A. (1999). Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. *Urology* 53, 1041-1048.

Aumüller, G., Seitz, J., Riva, A. (1994). Functional morphology of prostate gland. *Ultrastructure of Male Urogenital Glands.* A. Riva, F. Testa Riva and P. M. Motta. Boston, Kluwer Academic: 61-112.

Ayala, G., Thompson, T., Yang, G., Frolov, A., Li, R., Scardino, P., Ohori, M., Wheeler, T., Harper, W. (2004). High levels of phosphorylated form of Akt-1 in prostate cancer and non-neoplastic prostate tissues are strong predictors of biochemical recurrence. *Clin Cancer Res.* 10(19):6572-8.

Azevedo, A., Cunha V., Teixeira, A.L., Medeiros R. (2011). IL-6/IL-6R as a potential key signaling pathway in prostate cancer development. *World J Clin Oncol.* 2(12): 384–396.

Bai, X., Zhang, Y., Jiang, H., Yang, P., Li, H., Zhang, Y., He, P. (2016). Effects of maslinic acid on the proliferation and apoptosis of A549 lung cancer cells. *Mol Med Rep.*13(1):117-22.

Bailar, J.C., 3rd, Mellinger, G.T. y Gleason, D.F. (1966). Survival rates of patients with prostatic cancer, tumor stage, and differentiation--preliminary report. *Cancer Chemother Rep* 50, 129-136.

Bakin, A.V., Rinehart, C., Tomlinson, A.K., Arteaga, C.L. (2002). p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci.* 115:3193–3206.

Balkwill, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 361-371.

Balkwill, F., Mantovani, A. (2010). Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics. *Clin Pharmacol Ther;* 87(4):401-6.

Balkwill, F.R., Mantovani, A. (2012). Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Semin Cancer Biol;* 22(1):33-40.

- Balmanno, K., Cook, S.J. (2009). Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ.* 16(3):368-77.
- Barber, A.G., Castillo-Martin, M., Bonal, D.M., Jia, A.J., Rybicki, B.A., Christiano, A.M., Cordon-Cardo. (2015). PI3K/AKT pathway regulates E-cadherin and Desmoglein 2 in aggressive prostate cancer. *Cancer Med.* 4(8):1258-71.
- Barron, D.A., Rowley, D.R. (2012). The Reactive Stroma Microenvironment and Prostate Cancer Progression. *Endocr Relat Cancer* 19(6): R187–R204.
- Barros-Silva, J.D., Ribeiro, F.R., Rodrigues, A., Cruz, R., Martins, A.T., Jerónimo, C., Henrique, R., Teixeira, M.R. (2011). Relative 8q gain predicts disease-specific survival irrespective of the TMPRSS2-ERG fusion status in diagnostic biopsies of prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 50(8):662-71.
- Baseskioglu, B., Akdogan, B., Baydar, D.E., Ozen, H. (2010). Can p53, Ki-67 and bcl-2 predict biochemical failure after radical prostatectomy? *Indian J Urol.* 26(2):206-12.
- Baspinar, S., Bircan, S., Orhan, H., Kapucuoglu, N., Bozkurt, K.K. (2014). The relation of beclin 1 and bcl-2 expressions in high grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate adenocarcinoma: a tissue microarray study. *Pathol Res Pract.* 210(7):412-8.
- Bauer, J.J., Sesterhenn, I.A., Mostofi, F.K., McLeod, D.G., Srivastava, S., Moul, J.W. (1996). Elevated levels of apoptosis regulator proteins p53 and bcl-2 are independent prognostic biomarkers in surgically treated clinically localized prostate cancer. *J Urol.* 156(4):1511-6.
- Bedolla, R., Prihoda, T.J., Kreisberg, J.I., Malik, S.N., Krishnegowda, N.K., Troyer, D.A., Ghosh, P.M. (2007). Determining risk of biochemical recurrence in prostate cancer by immunohistochemical detection of PTEN expression and Akt activation. *Clin Cancer Res.* 13(13):3860-7.
- Beg, A.A., Baltimore, D. (1996). An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science.* 274(5288):782-4.
- Beier, R., Bürgin, A., Kiermaier, A., Fero, M., Karsunky, H., Saffrich, R., Möröy, T., Ansorge, W., Roberts, J., Eilers, M. (2000). Induction of cyclin E-cdk2 kinase activity, E2F-dependent transcription and cell growth by Myc are genetically separable events. *EMBO J.* 19(21):5813-23.
- Belanger, A., Candas, B., Dupont, A., Cusan, L., Diamond, P., Gomez, J.L., Labrie F. (1994). Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1086–1090.

Besson, A., Dowdy, S.F., Roberts, J.M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*. 14(2):159-69.

Bernard, D., Pourtier-Manzanedo, A., Gil, J., Beach, D.H. (2003). Myc confers androgen-independent prostate cancer cell growth. *J Clin Invest* 112(11):1724–3110.1172/JCI200319035.

Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11, 127-152.

Bertoli, C., Skotheim, J.M., de Bruin, R.A. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14(8):518-28.

Besson, A., Dowdy, S.F., Roberts, J.M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*. 14(2):159-69.

Bhoomik, A., Fichtman, B., DeRossi, C., Breitwieser, W., Kluger, H.M., Davis, S., Subtil, A., Meltzer, P., Krajewski, S., Nic Jones, N., Ronai, Z. (2008). Suppressor role of activating transcription factor 2 (ATF2) in skin cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(5): 1674–1679.

Bhowmick, N.A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C.A., Engel, M.E., Arteaga, C.L., Moses, H.L. (2001). Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*. 12(1):27-36.

Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332-337.

Bierie, B., Moses, H.L. (2006). TGF-beta and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 17(1-2):29-40.

Biswas, D.K., Cruz, A.P., Gansberger, E., Pardee, A.B. (2000). Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:8542–8547.

Black, A.R., Black, J.D. (2012). Protein kinase C signaling and cell cycle regulation. *Front Immunol*. 3: 423.

Borghi, A., Verstrepen, L., Beyaert, R. (2016). TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF-κB, MAP kinases and cell death. *Biochem Pharmacol*. pii: S0006-2952(16)00162-3.

Bosch, J.L., Tilling, K., Bohnen, A.M., Bangma, C.H., Donovan, J.L. (2007). Establishing normal reference ranges for prostate volume change with age in the population-based Krimpen-study: prediction of future prostate volume in individual men. *Prostate*. 67(16):1816-24.

Bostwick, D.G. (1996). Prospective origins of prostate carcinoma. Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia. *Cancer*. 15; 78(2):330-6.

Bostwick, D.G., Cheng, L. (2008). *Urologic Surgical Pathology: Expert Consult - Online and Print, 3e 3rd Edition*.

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

Booy, E.P., Henson, E.S., Gibson, S.B. (2011). Epidermal growth factor regulates Mcl-1 expression through the MAPK-Elk-1 signalling pathway contributing to cell survival in breast cancer. *Oncogene*. 30(20): 2367–2378.

Bozeman, C.B., Carver, B.S., Eastham, J.A., Venable, D.D. (2002). Treatment of chronic prostatitis lowers serum prostate specific antigen. *J Urol*. 167(4):1723-6.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-54.

Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J.J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, R.A., Davis, R.J. (2003). Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev*. 17(16): 1969–1978.

Brazil, D.P., Yang, Z.Z., Hemmings, B.A. (2004). Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*. 29(5):233-42.

Bretones, G., Delgado, M.D., León, J. (2015). Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta*. 1849(5):506-16.

Broom, O.J., Widjaya, B., Troelsen, J., Olsen, J., O H Nielsen, O.H. (2009). Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease? *Clin Exp Immunol*. 158(3): 272–280.

Brown, R.E., Zotalis, G., Zhang, P.L., Zhao, B. (2008). Morphoproteomic confirmation of a constitutively activated mTOR pathway in high grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 1(4):333-42.

- Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Sowd, S., Keyse, S., Sovyssêgur, J. (1998). Nuclear translocation of p42/p44 mitogen activated protein kinase is required for growth factor induced gene expression and cell cycle entry. *Eur Mol Biol Org.* 1998.8: 664-674.
- Bryant, R.J., Hans, G. Lilja, H.G. (2014). Emerging PSA-based tests to improve screening. *Urol Clin North* 41(2): 267–276.
- Bulavin, D.V., Kovalsky, O., Hollander, M.C., Fornace, A.J. Jr. (2003). Loss of Oncogenic H-ras-Induced Cell Cycle Arrest and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation by Disruption of Gadd45a *Mol Cell Biol.* 23(11): 3859–3871.
- Burotto, M., Chiou, V.L., Lee, J.M., Kohn, E.C. (2014). The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer.* 120(22): 3446–3456.
- Caamaño, J., Hunter, C.A. (2002). NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev.* 15(3):414-29.
- Cagnol, S., Chambard, J.C. (2010). ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death-391 -apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J* 277(1):2-21.
- Cansino, J.R., Vera, R., Rodríguez de Bethencourt, F., Bouraoui, Y., Rodríguez, G., Oueslati, R., Pérez-Utrilla, M., De la Peña, J., Paniagua, R., Royuela, M. (2009). Antígeno prostático-específico, citoquinas pro-inflamatorias y Patología prostática (Hiperplasia Benigna y Cáncer). Relación con la malignidad. *Arch. Esp.Urol.* 62(5): 359-66.
- Cansino, J.R., Vera, R., Rodríguez de Bethencourt, F., Bouraoui, Y., Rodríguez, G., Prieto, A., De la Peña, J., Paniagua, R., Royuela, M. (2011). Antígeno prostático específico y NF-KB en Patología prostática: relación con la malignidad. *Actas Urológicas Españolas.* 35(1): 16-21.
- Cekanova, M., Fernando, R.I., Siriwardhana, N., Sukhthankar, M., De la Parra, C., Woraratphoka, J., Malone, C., Ström, A., Baek, S.J., Wade, P.A., Saxton, A.M., Donnell, R.M., Pestell, R.G., Dharmawardhane, S., Wimalasena, J. (2015). BCL-2 family protein, BAD is down-regulated in breast cancer and inhibits cell invasion. *Exp Cell Res.* 331(1):1-10.
- Chambers, I., Smith, A. (2004). Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene.* 23(43):7150-60.
- Chan, S. C., Dehm, S. M. (2014). Constitutive Activity of the Androgen Receptor. *Adv Pharmacol.* 70: 327–366.

- Chang, L., Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 410(6824):37-40.
- Chang, L., Graham, P.H., Hao, J., Ni, J., Bucci, J., Cozzi, P.J., Kearsley, J.H., Li, Y. (2014). PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors enhance radiosensitivity in radioresistant prostate cancer cells through inducing apoptosis, reducing autophagy, suppressing NHEJ and HR repair pathways. *Cell Death Dis*. 5(10): e1437.
- Che, J.P., Li, W., Yan, Y., Liu, M., Wang, G.C., Li, Q.Y., Yang, B., Yao, X.D., Zheng, J.H. (2013). Expression and clinical significance of the nin one binding protein and p38 MAPK in prostate carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 6(11):2300-11.
- Che, M., DeSilvio, M., Pollack, A., Grignon, D.J., Venkatesan, V.M., Hanks, G.E., Sandler, H.M., RTOG. (2007). Prognostic value of abnormal p53 expression in locally advanced prostate cancer treated with androgen deprivation and radiotherapy: a study based on RTOG 9202. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 69(4):1117-23.
- Chebib, B., Auguste, A., Leary, A. (2015). The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges. *Chin J Cancer*; 34(1): 4–16.
- Chen, G., Cheng, Y., Zhang, Z., Martinka, M., Li, G. (2011). Prognostic significance of cytoplasmic p27 expression in human melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 20(10):2212-21.
- Chen, G., Goeddel, D. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 296, pp: 1634-1635.
- Chen, J., Jackson, P.K., Kirschner, M.W., Dutta, A. (1995). Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature*. 374(6520):386-8.
- Chen, L., Shi, Y., Jiang, C.Y., Wei, L.X., Wang, Y.L., Dai, G.H. (2011). Expression and prognostic role of pan-Ras, Raf-1, pMEK1 and pERK1/2 in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 37(6):513-20.
- Chen, N., Zhou, Q. (2016). The evolving Gleason grading system. *Chin J Cancer Res*. 28(1): 58–64.
- Chen, X., Cheng, H., Pan, T., Liu, Y., Su, Y., Ren, C., Huang, D., Zha, X., Liang, C. (2015a). mTOR regulate EMT through RhoA and Rac1 pathway in prostate cancer. *Mol Carcinog*. 54(10):1086-95.
- Chen, X.H., Liu, Z.C., Zhang, G., Wei, W., Wang, X.X., Wang, H., Ke, H.P., Zhang, F., Wang, H.S., Cai, S.H., Du, J. (2015b). TGF- β and EGF induced HLA-I downregulation is

associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) through upregulation of snail in prostate cancer cells. *Mol Immunol.* 65(1):34-42.

Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature.* 436(7051):725-30.

Cheville, J.C., Lloyd, R.V., Sebo, T.J., Cheng, L., Erickson, L., Bostwick, D.G., Lohse, C.M., Wollan, P. (1998). Expression of p27kip1 in prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 11(4):324-8.

Chia, S.J., Tang, W.Y., Elnatan, J., Yap, W.M., Goh, H.S., Smith, D.R. (2000). Prostate tumours from an Asian population: examination of bax, bcl-2, p53 and ras and identification of bax as a prognostic marker. *Br J Cancer.* 83(6):761-8.

Chipuk, J.E., Green, D.R. (2009). PUMA cooperates with direct activator proteins to promote mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Cell Cycle.* 8:2692–2696.

Choi, W.I., Kim, M.Y., Jeon, B.N., Koh, D.I., Yun, C.O., Li, Y., Lee, C.E., Oh, J., Kim, K., Hur, M.W. (2014). Role of promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) in cell proliferation and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21WAF/CDKN1A) gene repression. *J Biol Chem.* 289(27):18625-40.

Chong, Z. Z., Shang, Y. C., Wang, S., Maiese, K. (2012) A Critical Kinase Cascade in Neurological Disorders: PI 3-K, Akt, and mTOR. *Future Neurol.* 7(6): 733–748.

Choy, B., Pearce, S.M., Anderson, B.B., Shalhav, A.L., Zagaja, G., Eggener, S.E., Paner, G.P. (2016). Prognostic Significance of Percentage and Architectural Types of Contemporary Gleason Pattern 4 Prostate Cancer in Radical Prostatectomy. *Am J Surg Pathol.* 40(10):1400-6.

Chu, I.M., Hengst, L., Slingerland, J.M. (2008). The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 8(4):253-67.

Ciftci, R., Tas, F., Yasasever, C.T., Aksit, E., Karabulut, S., Sen, F., Keskin, S., Kilic, L., Yildiz, I., Bozbey, H.U., Duranyildiz, D., Vatansever, S. (2014). High serum transforming growth factor beta 1 (TGFB1) level predicts better survival in breast cancer. *Tumour Biol.* 35(7):6941-8.

Clegg, N.J., Couto, S.S., Wongvipat, J., Hieronymus, H., Carver, B.S., Taylor, B.S., Ellwood-Yen, K., Gerald, W.L., Sander, C., Sawyers, C.L. (2011). MYC Cooperates with

AKT in Prostate Tumorigenesis and Alters Sensitivity to mTOR Inhibitors. *PLoS One*. 6(3): e17449.

Cohen, I., Rider, P., Carmi, Y., Braiman, A., Dotan, S., White, M.R., Voronov, E., Martin, M.U., Dinarello, C.A., Apte, R.N. (2010). Differential release of chromatin-bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(6):2574-9.

Coffey, D.S., Walsh, P.C. (1990). Clinical and experimental studies of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am*. 17:461-475.

Cole, M.D., McMahon, S.B. (1999). The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene*. 18(19):2916-24.

Conacci-Sorrell, M., Ngouenet, C. Anderson, S., Brabletz, T., Robert N. Eisenman, R.N. (2014). Stress-induced cleavage of Myc promotes cancer cell survival. *Genes Dev*. 28(7): 689-707.

Cooks, T., Pateras, I.S., Tarcic, O., Solomon, H., Schetter, A.J., Wilder, S, Lozano, G., Pikarsky, E., Forshev, T., Rozenfeld, N., Noam Harpaz, N., Itzkowitz, S., Harris, C.C., Varda Rotter, V., Gorgoulis, V.G., Moshe Oren, M. (2013). Mutant p53 prolongs NF- κ B activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer. *Cancer Cell*. 2013;23:634-646.

Cowling, V.H., Chandriani, S., Whitfield, M.L., Cole, M.D. (2006). A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. *Mol Cell Biol*. 26(11):4226-39.

Culig, Z., Puhr, M. (2012). Interleukin-6: A multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 360(1-2): 52-58.

Cullen, P.J., Lockyer, P.J (2002). Integration of calcium and Ras signaling *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3, 5, pp: 339-348.

Cunha, G.R. (1972). Epithelio-mesenchymal interactions in primordial gland structures which become responsive to androgenic stimulation. *Anat Rec*. 172(2):179-95.

Cunha, G. R. (1994). Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of male urogenital glands. *Ultrastructure of the Male Urogenital Glands*. A. Riva, F. Testa Riva and P. M. Motta. Boston, Kluwer Academic: 14-34.

Cunha, G.R. (2008). Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future. *Differentiation*. 76(6): 578-586.

Cunha, G.R., Donjacour, A. (1987). Stromal-epithelial interactions in normal and abnormal prostatic development *Prog Clin Biol Res.* 239:251-72.

Dai, Y., Grant, S. (2007). Targeting multiple arms of the apoptotic regulatory machinery. *Cancer Res.* 67(7):2908-11.

Dan, H.C., Cooper, M.J., Cogswell, P.C., Duncan, J.A., Ting, J.P., Baldwin, A.S. (2008). Akt-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes Dev.* 22(11):1490-500.

Dang, C.V. (2012). MYC on the Path to Cancer. *Cell.* 149(1): 22–35.

Dang, C.V., Lee, W.M. (1988). Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Mol Cell Biol.* 8(10):4048-54.

Darcy, K.M., Brady, W.E., Blancato, J.K., Dickson, R.B., Hoskins, W.J., McGuire, W.P., Birrer, M.J. (2009). Prognostic relevance of c-MYC gene amplification and polysomy for chromosome 8 in suboptimally-resected, advanced stage epithelial ovarian cancers: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 114(3):472-9.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 91(2):231-41.

Davids, M.S., Letai, A. (2012). Targeting the B-cell lymphoma/leukemia 2 family in cancer. *J Clin Oncol.* 30(25):3127-35.

De Marzo, A.M., Meeker, A.K., Epstein, J.I., Coffey, D.S. (1998a). Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. *Am J Pathol.* 153(3):911-9.

De Marzo, A.M., Meeker, A.K., Epstein, J.I., Coffey, D.S. (1998c). Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. *Am J Pathol.* 153(3):911-9.

De Marzo, A.M., Nelson, W.G., Meeker, A.K., Coffey, D.S. (1998b). Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *J Urol.* 160(6 Pt. 2):2381-92.

De Miguel, P., Royuela, M., Bethencourt, R., Ruiz, A., Fraile, B., Paniagua, R. (1999). Immunohistochemical comparative analysis of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in normal, hyperplastic and neoplastic human prostates. *Cytokine.* 11(9):722-7.

- DeLancey, J.O., Wood, D.P. Jr, He, C., Montgomery, J.S., Weizer, A.Z., Miller, D.C., Jacobs, B.L., Montie, J.E., Hollenbeck, B.K., Skolarus, T.A. (2013). Evidence of perineural invasion on prostate biopsy specimen and survival after radical prostatectomy. *Urology*. 81(2):354-7.
- Dél ris, P., Trost, M., Topisirovic, I., Tanguay, P.L., Borden, K.L., Thibault, P., Meloche, S. (2011). Activation loop phosphorylation of ERK3/ERK4 by group I p21-activated kinases (PAKs) defines a novel PAK-ERK3/4-MAPK-activated protein kinase 5 signaling pathway. *J Biol Chem*. 286(8):6470-8.
- Demaria, S., Pikarsky, E., Karin, M., Coussens, L.M., Chen, Y.C., El-Omar, E.M., Trinchieri, G., Dubinett, S.M., Mao, J.T., Szabo, E., Krieg, A., Weiner, G.J., Fox, B.A., Coukos, G., Wang E., Abraham, R.T., Carbone, M., Lotze, M.T. (2010). Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. *J Immunother*. 33(4):335-51.
- Deng, X., Liu, H., Huang, J., Cheng, L., Keller, E.T., Parsons, S.J., Hu, C.D. (2008). Ionizing radiation induces prostate cancer neuroendocrine differentiation through interplay of CREB and ATF2: implications for disease progression. *Cancer Res*. 68(23):9663-70.
- Denicourt, C., Saenz, C.C., Datnow, B., Cui, X.S., Dowdy, S.F. (2007). Relocalized p27Kip1 tumor suppressor functions as a cytoplasmic metastatic oncogene in melanoma. *Cancer Res*. 67(19):9238-43.
- Derynck, R., Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 425(6958):577-84.
- DiDonato, J.A., Mercurio, F., Karin, M. (2012). NF-κB and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev*. 246(1):379-400.
- Diallo, J.S., Aldejmah, A., Mouhim, A.F., P ant, B., Fahmy, M.A., Koumakpayi, I.H., Sircar, K., Bégin, L.R., Mes-Masson, A.M., Saad, F. (2007). NOXA and PUMA expression add to clinical markers in predicting biochemical recurrence of prostate cancer patients in a survival tree model. *Clin Cancer Res*. 13(23):7044-52.
- Dinarello, C.A. (1998). Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol*. 16(5-6):457-99.
- Dinarello, C.A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Ann Rev Immunol*. 27:519–550.
- Dinarello, C.A. (2010). Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer Metastasis Rev*. 29(2): 317–329.

Dinarello, C.A. (2011). A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol.* 41(5):1203-17.

Dinarello, C.A. (2012). Membrane interleukin-18 revisits membrane IL-1 α in T-helper type 1 responses. *Eur J Immunol.* 42(6):1385-7.

Dinarello, C.A., van der Meer, J.W. (2013). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol.* 25(6):469-84.

Dinarello, C.A. (2014). Interleukin-1 α neutralisation in patients with cancer. *Lancet Oncol.* 15(6):552-3.

Ding, Q., He, X., Xia, W., Hsu, J.M., Chen, C.T., Li, L.Y., Lee, D.F., Yang, J.Y., Xie, X., Liu, J.C., Hung, M.C. (2007). Myeloid cell leukemia-1 inversely correlates with glycogen synthase kinase-3 β activity and associates with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res.* 67(10):4564-71.

Ding, Z., Wu, C.J., Chu, G.C., Xiao, Y., Ho, D., Zhang, J., Perry, S.R., Labrot, E.S., Wu, X., Lis, R., Hoshida, Y., Hiller, D., Hu, B., Jiang, S., Zheng, H., Stegh, A.H., Scott, K.L., Signoretti, S., Bardeesy, N., Wang, Y.A., Hill, D.E., Golub, T.R., Stampfer, M.J., Wong, W.H., Loda, M., Mucci, L., Chin, L., DePinho, R.A. (2011). SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature.* 470(7333):269-73

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

Dong, C., Davis, R.J., Flavell, R.A. (2002). MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol.* 20():55-72.

Dotto, G.P. (2000). p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta.* 1471(1):M43-56.

Drake, R. L., Vogl, A.W., Mitchell, A.W.M. (2010). Gray: Anatomía para estudiantes. 2^a ed. Elsevier. España.

Dubrez, L., Berthelet, J., Glorian, V. (2013). IAP proteins as targets for drug development in oncology. *Onco Targets Ther.* 9:1285-304.

Duchrow, M., Schlüter, C., Wohlenberg, C., Flad, H.D., Gerdes, J. (1996). Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif.* 29(1):1-12.

- Dulić, V., Stein, G.H., Far, D.F., Reed, S.I. (1998). Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol Cell Biol.* 18(1):546-57.
- Dutt, S.S., Allen, C.G. (2009). Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression. *Future Oncol.* 5(9): 1403–1413.
- Dvorak, H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal: similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England Journal of Medicine.* 315(26):1650–1659.
- Eastham, J.A. (2005). Prostate-specific antigen doubling time as a prognostic marker in prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol.* 2(10): 482-491.
- Edwards, J., Krishna, N.S., Witton, C.J., Bartlett, J.M. (2003). Gene amplifications associated with the development of hormone-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 9(14):5271–81.
- Eisinger, D.A., Ammer, H. (2008). δ -opioid receptors activate ERK/MAP kinase via integrin-stimulated receptor tyrosine kinases. *Cellular Signalling.* 20, pp: 2324–2331.
- Eferl, R., Wagner, E.F. (2003). AP1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Rev Cancer.* 3:859–868.
- Egger, J.V., Lane, M.V., Antonucci, L.A., Dedi, B., Krucher, N.A. (2016). Dephosphorylation of the Retinoblastoma protein (Rb) inhibits cancer cell EMT via Zeb. *Cancer Biol Ther.* 17(11):1197-1205.
- Elaraj, D.M., White, D.E., Steinberg, S.M., Haworth, L., Steven A. Rosenberg, S.A., James C. Yang, J.C. (2004). A Pilot Study of Antiangiogenic Therapy with Bevacizumab and Thalidomide in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *J Immunother.* 27(4): 259–264.
- Elfiky, A.A., Aziz, S.A., Conrad, P.J., Siddiqui, S., Hackl, W., Maira, M., Robert, C.L., Kluger, H.M. (2011). Characterization and targeting of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal cell cancer. *J Transl Med.* 9:133.
- Elgavish, A., Wood, P.A., Pinkert, C.A., Eltoum, I.E., Cartee, T., Wilbanks, J., Mentor-Marcel, R., Tian, L., Scroggins, S.E. (2004). Transgenic mouse with human mutant p53 expression in the prostate epithelium. *Prostate.* 61:26–34.
- Elkhwaji, J. (2012). The role of inflammatory mediators in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Res Rep Urol.* 5: 1–10.

Elliott, R.L., Blobe, G.C. (2005). Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol.* 23(9):2078-93.

English, H.F., Santen, R.J. y Isaacs, J.T. (1987). Response of glandular versus basal rat ventral prostatic epithelial cells to androgen withdrawal and replacement. *Prostate.* 11, 229-242.

Enslin, H., Branchio, D.M., Davis, R.J. (2000). Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *EMBO J.* 19(6):1301-11.

Epstein, J.I., Partin, A.W., Potter, S.R., Walsh, P.C. (2000). Adenocarcinoma of the prostate invading the seminal vesicle: prognostic stratification based on pathologic parameters. *Urology.* 56(2): 283-288.

Epstein, J.I., Amin, M., Boccon-Gibod, L., Egevad, L., Humphrey, P.A., Mikuz, G., Newling, D., Nilsson, S., Sakr, W., Srigley, J.R., Wheeler, T.M., Montironi, R. (2005). Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 216: 34-63.

Epstein, J.I. (2010). An update of the Gleason grading system. *J Urol.* 183, 433-440.

Epstein, J.I., Egevad, L., Amin, M.B., Delahunt, B., Srigley, J.R., Humphrey, P.A.; Grading Committee. (2014). The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol.* 40(2):244-52.

España, L., Fernández, Y., Rubio, N., Torregrosa, A., Blanco, J., Sierra, A. (2004). Overexpression of Bcl-xl in human breast cancer cells enhances organ-selective lymph node metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* 87, pp: 33-44.

Estep, A.L., Palmer, C., McCormick, F., Rauen, K.A. (2007). Mutation analysis of BRAF, MEK1 and MEK2 in 15 ovarian cancer cell lines: implications for therapy. *PLoS One.* 2(12):e1279.

Facompre, N.D., Sinha, I., El-Bayoumy, K., Pinto, J.T., Sinha, R. (2012). Remarkable inhibition of mTOR signaling by the combination of rapamycin and 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate in human prostate cancer cells. *Int J Cancer.* 131(9):2134-42.

Falkenhorst, J., Grunewald, S., Mühlberg, T., Marino-Enriquez, A., Reis, A.C., Corless, C., Heinrich, M., Treckmann, J., Podleska, L.E., Schuler, M., Fletcher, J.A., Bauer, S. (2016). Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) are commonly dysregulated in GIST and can be pharmacologically targeted to enhance the pro-apoptotic activity of imatinib. *Oncotarget.* 7(27):41390-41403.

- Feng, Y., Wen, J., Chang, C.C. (2009). p38 Mitogen-activated protein kinase and hematologic malignancies. *Arch Pathol Lab Med.* 133(11):1850-6.
- Feldman, B.J., Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* 1:35-45.
- Fernandez, Y., España, L., Mañas, S., Fabra, A., Sierra, A. (2000). Bcl-x1 promotes metástasis of breast cáncer cells by induction of cytokines resistance. *Cell Death Differ.* 7, pp: 350-359.
- Fibbi, B., Penna, G., Morelli, A., Adorini, L., Maggi, M. (2010). "Chronic inflammation in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia." *Int J Androl.* 33(3): 475-488.
- Fischmann TO, Smith CK, Mayhood TW, Myers JE, Reichert P, Mannarino A, Carr D, Zhu, H., Wong, J., Yang, R.S., Le, H.V., Madison, V.S. (2009). Crystal structures of MEK1 binary and ternary complexes with nucleotides and inhibitors. *Biochemistry.* 48(12):2661-74.
- Fisher, G., Yang, Z.H., Kudahetti, S., Møller, H., Scardino, P., Cuzick, J., Berney, D.M.; Transatlantic Prostate Group. (2013). Prognostic value of Ki-67 for prostate cancer death in a conservatively managed cohort. *Br J Cancer.* 108(2):271-7.
- Fizazi, K., Martinez, L.A., Sikes, C.R., Johnston, D.A., Stephens, L.C., McDonnell, T.J., Logothetis, C.J., Trapman, J., Pisters, L.L., Ordoñez, N.G., Troncoso, P., Navone, N.M. (2002). The association of p21(WAF-1/CIP1) with progression to androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 8(3):775-81.
- Florkowska, M., Tymoszek, P., Balwierz, A., Skucha, A., Kochan, J., Wawro, M., Stalinska, K., Kasza, A. (2012). EGF activates TTP expression by activation of ELK-1 and EGR-1 transcription factors. *BMC Mol Biol.* 13: 8.
- Follis, A.V., Hammoudeh, D.I., Daab, A.T., Metallo, S.J. (2009). Small-molecule perturbation of competing interactions between c-Myc and Max. *Bioorg Med Chem Lett.* 19(3):807-10.
- Forest, M.G. (1979). Plasma androgens (testosterone and 4-androstenedione) and 17-hydroxyprogesterone in the neonatal, prepubertal, and peripubertal periods in the human and the rat: Differences between species. *J Steroid Biochem.* 11:543–548.
- Frade, J.M., Ovejero-Benito, C.O. (2015). Neuronal cell cycle: the neuron itself and its circumstances. *Cell Cycle.* 14(5): 712–720.

Freedland, S.J., Mangold, L.A., Walsh, P.C., Partin, A.W. (2005). The prostatic specific antigen era is alive and well: prostatic specific antigen and biochemical progression following radical prostatectomy. *J Urol.* 174(4 Pt 1): 1276-1281.

Freedland, S.J., Hotaling, J.M., Fitzsimons, N.J., Presti, J.C. Jr, Kane, C.J., Terris, M.K., Aronson, W.J., Amling, C.L. (2008) PSA in the new millennium: a powerful predictor of prostate cancer prognosis and radical prostatectomy outcomes--results from the SEARCH database. *Eur Urol.* 53(4): 758-764.

Fresno, J.A, Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 30(2):193-204.

Frey, M.R., Clark, J.A., Leontieva, O., Uronis, J.M., Black, A.R., Black, J.D. (2000). Protein kinase C signaling mediates a program of cell cycle withdrawal in the intestinal epithelium. *J Cell Biol.* 151(4):763-78.

Fromont, G., Godet, J., Peyret, A., Irani, J., Celhay, O., Rozet, F., Cathelineau, X., Cussenot, O. (2013). 8q24 amplification is associated with Myc expression and prostate cancer progression and is an independent predictor of recurrence after radical prostatectomy. *Hum Pathol.* 44(8):1617-23.

Fuentes-Prior, P., Salvesen, G.S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.* 384(Pt 2):201-32.

Fuxe, J., Karlsson, M.C. (2012). TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition: a link between cancer and inflammation. *Semin Cancer Biol.* 22(5-6):455-61.

Gaire, M., Chatton, B., Kedingler, C. (1990). Isolation and characterization of two novel, closely related ATF cDNA clones from HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* 18(12):3467-73.

Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Kroemer, G. (2015). Necrosis: Linking the Inflammasome to Inflammation. *Cell Rep.* 11(10):1501-2.

Gamble, C., McIntosh, K., Scott, R., Ho, K.H., Plevin, R., Paul, A. (2012). Inhibitory kappa B Kinases as targets for pharmacological regulation. *Br J Pharmacol.* 165(4):802-19.

Gannon, P.O., Lessard, L., Stevens, L.M., Forest, V., Bégin, L.R., Minner, S., Tennstedt, P., Schlomm, T., Mes-Masson, A.M., Saad, F. (2013). Large-scale independent validation of the nuclear factor-kappa B p65 prognostic biomarker in prostate cancer. *Eur J Cancer.* 49(10):2441-8.

Gao, L., Chao, L., Chao, J. (2010). A novel signaling pathway of tissue kallikrein in promoting keratinocyte migration: activation of proteinase-activated receptor 1 and epidermal growth factor receptor. *Experimental Cell Research.* 316, 3, pp: 376–389.

Gao, N., Zhang, Z., Jiang, B.H., Shi, X. (2003). Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 310(4):1124-32.

García, Z., Kumar, A., Marqués, M., Cortés, I., Carrera, A.C. (2006). Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division. *EMBO J.* 25(4):655-61.

Gartel, A. L. (2006). Is p21 an oncogene? *Mol. Cancer Ther.* 5 (6) 1385–1386.

Garlanda, C., Dinarello, C.A., Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 39(6):1003-18.

Garrett-Engele, C.M., Tasch, M.A., Hwang, H.C., Fero, M.L., Perlmutter, R.M., Clurman, B.E., Roberts, J.M. (2007). A mechanism misregulating p27 in tumors discovered in a functional genomic screen. *PLoS Genet.* 3(12):e219.

Gil, J., Kerai, P., Lleonart, M., Bernard, D., Cigudosa, J.C., Peters, G., Carnero, A., Beach, D. (2005). Immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc. *Cancer Res.* 65(6):2179-85.

Gioeli, D., Mandell, J.W., Petroni, G.R., Frierson, H.F. Jr., Weber, M.J. (1999). Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res.* 59(2):279-84.

Giri, D., Ozen, M., Ittmann, M. (2001). Interleukin-6 is an autocrine growth factor in human prostate cancer. *Am J Pathol.* 159(6): 2159-65.

Gleason, D.F, Mellinger, G.T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol.* 111, 58 64.

Gogada, R., Yadav, N., Liu, J., Tang, S., Zhang, D., Schneider, A., Seshadri, A., Sun, L., Marcelo-Aldaz, C., Tang, D.G., Chandra, D. (2013). Bim, a propapoptotic protein, up-regulated via transcription factor E2F1-dependent mechanism, functions as a prosurvival molecule in cancer. *The Journal Biological chemistry.* 288, 1, pp: 368-381.

González-González R., Molina-Frechero, N., Damian-Matsumura P., y Bologna-Molina R. (2013). Molecular markers of cell adhesion in ameloblastomas. An update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 19(1): e8–e14.

Gordetsky, J., Epstein, J. (2016). Grading of prostatic adenocarcinoma: current state and prognostic implications. *Diagn Pathol.* 11: 25.

Greenberg, A.K., Basu, S., Hu, J., Yie, T.A., Tchou-Wong, K.M., Rom, W.N., Lee, T.C. (2002). Selective p38 activation in human non-small cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 26(5):558-64.

Gregg, J., Fraizer, G. (2011). Transcriptional Regulation of EGR1 by EGF and the ERK Signaling Pathway in Prostate Cancer Cells. *Genes Cancer.* 2:900-9.

Gregory, M.A., Hann, S.R. (2000). c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Mol Cell Biol.* 20(7):2423-35.

Gregory, M.A., Qi, Y., Hann, S.R. (2003). Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. *J Biol Chem.* 278(51):51606-12.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 140(6):883-99.

Grossi, V., Peserico, A., Tezil, T., Simone, C. (2014). p38 α MAPK pathway: A key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. *World J Gastroenterol.* 20(29): 9744–9758.

Grossmann, M.E., Huang, H., Tindall, D.J. (2001). Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 93(22):1687-97.

Guha, M., Altieri, D.C. (2009). Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks. *Cell Cycle.* 8(17):2708-10.

Guicciardi, M.E., Gores, G.J. (2009). Life and death by death receptors. *FASEB J.* 23(6):1625-37.

Guo, H., Tian, T., Nan, K., Wang, W. (2010). p57: A multifunctional protein in cancer (Review). *Int J Oncol.* 36(6):1321-9.

Guo, Y., Jacobs, S.C., Kyprianou, N. (1997). Down-regulation of protein and mRNA expression for transforming growth factor-beta (TGF-beta1) type I and type II receptors in human prostate cancer. *Int J Cancer.* 71(4):573-9.

Gurel, B., Iwata, T., Koh, C.M., Jenkins, R.B., Lan, F., Van Dang, C., Hicks, J.L., Morgan, J., Cornish, T.C., Sutcliffe, S., Isaacs, W.B., Luo, J., De Marzo, A.M. (2008). Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis. *Mod Pathol.* 21(9):1156-67.

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

- Hager, J.H., Ulanet, D.B., Hennighausen, L., Hannahan, D. (2009). Genetic ablation of Bcl-xl attenuates invasiveness without affecting apoptosis or tumor growth in a mouse model of pancreatic neuroendocrine cancer. *PLoS One*. 4, 2, pp: 1-13.
- Hägglman, M.J., Macoska, J.A., Wojno, K.J., Oesterling, J.E. (1997). The relationship between prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer: critical issues. *J Urol*. 158(1):12-22.
- Hahn, A.M., Myers, J.D., McFarland, E.K., Lee, S., Jerde, T.J. (2014). Interleukin-Driven Insulin-Like Growth Factor Promotes Prostatic Inflammatory Hyperplasia *J Pharmacol Exp Ther*. 351(3): 605–615.
- Hai, T. (2006). The ATF transcription factors in cellular adaptive responses. *Gene Expression and Regulation*. Springer; New York, USA: pp. 322–333.
- Hai, T.W., Liu, F., Allegretto, E.A., Karin, M., Green, M.R. (1988). A family of immunologically related transcription factors that includes multiple forms of ATF and AP-1. *Genes Dev*. 2(10):1216-26.
- Halvorsen, O.J., Haukaas, S.A., Akslen, L.A. (2003). Combined loss of PTEN and p27 expression is associated with tumor cell proliferation by Ki-67 and increased risk of recurrent disease in localized prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 9(4):1474-9.
- Hamilton, G., Abraham, A.G., Morton, J., Sampson, O., Pefani1, D.E., Khoronenkova, S., Grawenda, A., Papaspyropoulos, A., Jamieson, N., McKay, C., Sansom, O., Dianov, G.L., O’Neill, E. (2014). AKT regulates NPM dependent ARF localization and p53mut stability in tumors. *Oncotarget*, Vol. 5, No. 15.
- Han, J., Lee, J.D., Jiang, Y., Li, Z., Feng, L., Ulevitch, R.J. (1996). Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6) *J Biol Chem*. 271:2886–2891.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. 100, 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144: 646-74.
- Hata, A., Engelman, J.A., Faber, A.C. (2015). The BCL-2 family: key mediators of the apoptotic response to targeted anti-cancer therapeutics. *Cancer Discov*. 5(5): 475–487.
- Hata, A., Davis, B.N. (2009). Control of microRNA biogenesis by TGFbeta signaling pathway-A novel role of Smads in the nucleus. *Cytokine Growth Factor Rev*. 20(5-6):517-21.

Hawksworth, D., Ravindranath, L., Chen, Y., Furusato, B., Sesterhenn, I.A., McLeod, D.G., Srivastava, S., Petrovics, G. (2010). Overexpression of C-MYC oncogene in prostate cancer predicts biochemical recurrence. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 13(4):311-5.

Hay, N., Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18(16):1926-45.

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

Henley, S. A., Dick, F. A. (2012). The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle *Cell Div.* 7: 10.

Hermeking, H. (2003). The MYC oncogene as a cancer drug target. *Curr Cancer Drug Targets.* 3(3):163-75.

Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J.F., Obaya, A.J., O'Connell, B.C., Mateyak, M.K., Tam, W., Kohlhuber, F., Dang, C.V., Sedivy, J.M., Eick, D., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (2000). Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 97:2229–34.

Hernes, E., Fossa, S.D., Berner, A., Otnes, B., Nesland, J.M. (2004). Expression of the epidermal growth factor receptor family in prostate carcinoma before and during androgen-independence. *Br J Cancer.* 90:449–454.

Herrera, R.E., Maikela, T.P., Weinberg, R.A. (1996). TGF β 3-induced growth inhibition in primary fibroblasts requires the retinoblastoma protein. *Mol Biol Cell.* 7: 1335-1342.

Hibi, M., Nakajima, K., Hirano, T. (1996). IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med (Berl).* 74(1):1-12.

Hinz M., Scheidereit, C. (2014). The I κ B kinase complex in NF- κ B regulation and beyond. *EMBO Rep.* 15(1): 46–61.

Hobisch, A., Rogatsch, H., Hittmair, A., Fuchs, D., Bartsch, G. Jr., Klocker, H., Bartsch, G., Culig, Z. (2000). Immunohistochemical localization of interleukin-6 and its receptor in benign, premalignant and malignant prostate tissue. *J Pathol.* 191(3):239-44.

- Hoesel, B., Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 12: 86.
- Hoffman, B., Liebermann, D.A. (1998). The proto-oncogene c-myc and apoptosis. *Oncogene*. 17(25):3351-7.
- Hong, S.K., Kim, J.H., Lin, M.F., Park, J.I. (2011). The Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway can mediate growth inhibitory and differentiation signaling via androgen receptor downregulation in prostate cancer cells. *Exp Cell Res*. 317(18):2671-82.
- Hoogland, A.M., Kweldam, C.F., van Leenders, G.J. (2014). Prognostic Histopathological and Molecular Markers on Prostate Cancer Needle-Biopsies. *Biomed Res Int*. 2014: 341324.
- Horita, M., Andreu, E.J., Benito, A., Arbona, C., Sanz, C., Benet, I., Prosper, F., Fernandez-Luna, J.L. (2000). Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med*. pp:977-984.
- Hu, J., Banerjee, A., Goss, D.J. (2005). Assembly of b/HLH/z proteins c-Myc, Max, and Mad1 with cognate DNA: importance of protein-protein and protein-DNA interactions. *Biochemistry*. 44(35):11855-63.
- Huang, J.J., Chu, H.X., Jiang, Z.Y., Zhang, X.J., Sun, H.P., You, Q.D. (2014). Recent advances in the structure-based and ligand-based design of IKK β inhibitors as anti-inflammation and anti-cancer agents. *Curr Med Chem*. 21(34):3893-917.
- Huber, M.A., Azoitei, N., Baumann, B., Grünert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., Wirth, T. (2004). NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest*. 114(4):569-81.
- Hunter, D., Davies, J. (1997). The Glandular Organ Development Database. Medical Research Council; 1997. An Overview of Prostate Gland Development.
- Huynh, H. (2002). Induction of apoptosis in rat ventral prostate by finasteride is associated with alteration in MAP kinase pathways and Bcl-2 related family of proteins. *Int J Oncol*. 20(6):1297-303.
- Hynes, N.E., Lane, H.A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 5(5):341-54.

Ilic, N., Utermark, T., Widlund, H.R., Roberts, T.M. (2011). PI3K-targeted therapy can be evaded by gene amplification along the MYC-eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) axis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(37):E699-708.

Imada, K., Shiota, M., Kohashi, K., Kuroiwa, K., Song, Y., Sugimoto, M., Naito, S., Oda, Y. (2013). Mutual regulation between Raf/MEK/ERK signaling and Y-box-binding protein-1 promotes prostate cancer progression. *Clin Cancer Res.* 19(17):4638-50.

Imamura, T., Hikita, A., Inoue, Y. (2012). The roles of TGF- β signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis. *Breast Cancer.* 19(2):118-24.

Ioachim, E. (2008). Expression patterns of cyclins D1, E and cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf1/cip1, p27kip1 in colorectal carcinoma: correlation with other cell cycle regulators (pRb, p53 and Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. *Int J Clin Pract.* 62(11):1736-43.

Iyoda, K., Sasaki, Y., Horimoto, M., Toyama, T., Yakushijin, T., Sakakibara, M., Takehara, T., Fujimoto, J., Hori, M., Wands, J.R., Hayashi, N. (2003). Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 97(12):3017-26.

Jain, A.K., Raina, K., Agarwal, R. (2013). Deletion of p21/Cdkn1a confers protective effect against prostate tumorigenesis in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. *Cell Cycle.* 12(10):1598-604.

Jain, G., Cronauer, M.V., Schrader, M., Möller, P., Marienfeld, R.B. (2012). NF- κ B signaling in prostate cancer: a promising therapeutic target? *World J Urol.* 30(3):303-10.

Jenkins, R.B., Qian, J., Lieber, M.M., Bostwick, D.G. (1997). Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.* 57(3):524-31.

Jeong, J.H., Wang, Z., Guimaraes, A.S., Ouyang, X., Figueiredo, J.L., Ding, Z., Jiang, S., Guney, I., Kang, G.H., Shin, E., Hahn, W.C., Loda, M.F., Abate-Shen, C., Weissleder, R., Chin, L. (2008). BRAF activation initiates but does not maintain invasive prostate adenocarcinoma. *PLoS One.* 3(12):e3949.

Jiang, A.G., Yu, H., Huang, J.A. (2014), Expression and clinical significance of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signal transduction pathway in non-small cell lung carcinoma. *Oncol Lett.* 8(2):601-607.

Jiang, T., Jiang, H., Song, X.S., Li, X.C., Li, Q.L. (2005). P53 expression and its clinical significance in prostatic carcinoma. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 11:448–51.454.

- Jin, R., Yi, Y., Yull, F.E., Blackwell, T.S., Clark, P.E., Koyama, T., Smith, J.A., Matusik, R.J. (2014). NF- κ B gene signature predicts prostate cancer progression. *Cancer Res.* 74(10): 2763–2772.
- Jin, Z., El-Deiry, W.S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 4(2):139-63.
- Kahn, B., Collazo, J., Natasha Kyprianou, N. (2014). Androgen Receptor as a Driver of Therapeutic Resistance in Advanced Prostate Cancer. *Int J Biol Sci.* 10(6):588-595.
- Kajanne, R., Miettinen, P., Tenhunen, M., Leppä, S. (2009). Transcription factor AP-1 promotes growth and radioresistance in prostate cancer cells. *Int J Oncol.* 35(5):1175-82.
- Kanazawa, T., Nishino, H., Hasegawa, M., Ohta, Y., Iino, Y., Ichimura, K., Noda, Y. (2007). Interleukin-6 directly influences proliferation and invasion potential of head and neck cancer cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 264(7):815-21.
- Kaltz-Wittmer, C., Klenk, U., Glaessgen, A., Aust, D.E., Diebold, J., Löhrs, U., Baretton, G.B. (2000). FISH analysis of gene aberrations (MYC, CCND1, ERBB2, RB, and AR) in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy. *Lab Invest.* 80(9):1455-64.
- Karimian, A., Ahmadi, Y., Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst).* 42:63-71
- Karlou, M., Saetta, A.A., Korkolopoulou, P., Levidou, G., Papanastasiou, P., Boltetsou, E., Isaiadis, D., Pavlopoulos, P., Thymara, I., Thomas-Tsagli, E., Patsouris, E. (2009). Activation of extracellular regulated kinases (ERK1/2) predicts poor prognosis in urothelial bladder carcinoma and is not associated with B-Raf gene mutations. *Pathology.* 41(4):327-34.
- Kattan, M.W., Potters, L., Blasko, J.C., Beyer, D.C., Fearn, P., Cavanagh, W., Leibel, S., Scardino, P.T. (2001). Pretreatment nomogram for predicting freedom from recurrence after permanent prostate brachytherapy in prostate cancer. *Urology.* 58(3): 393-399.
- Kattan, M.W., Shariat, S.F., Andrews, B., Zhu, K., Canto, E., Matsumoto, K., Muramoto, M., Scardino, P.T., Ohori, M., Wheeler, T.M., Slawin, K.M. (2003). The addition of interleukin-6 soluble receptor and transforming growth factor beta1 improves a preoperative nomogram for predicting biochemical progression in patients with clinically localized prostate cancer. *J Clin Oncol.* 21(19):3573-9.
- Kattan, M.W., Wheeler, T.M., Scardino, P.T. (1999). Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Clin Oncol.* 17(5): 1499-1507.

Kawahara, T., Aljarah, A.K., Shareef, H.K., Inoue, S., Ide, H., Patterson, J.D., Kashiwagi, E., Han, B, Li, Y., Zheng, Y., Miyamoto, H. (2016). Silodosin inhibits prostate cancer cell growth via ELK1 inactivation and enhances the cytotoxic activity of gemcitabine. *Prostate*. 76(8):744-56.

Keibel, A., Singh, V., Sharma, M.C. (2009). Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression. *Curr Pharm Des*. 15(17):1949-55.

Kench, J.G., Clouston, D.R., Delprado, W., Eade, T., Ellis, D., Horvath, L.G., Samaratunga, H., Stahl, J., Stapleton, A.M., Egevad, L., Srigley, J.R., Delahunt, B. (2011). Prognostic factors in prostate cancer. Key elements in structured histopathology reporting of radical prostatectomy specimens. *Pathology*. 43(5): 410-419.

Khan, S.A., Amnekar, R., Khade, B., Barreto, S.G., Ramadwar, M., Shrikhande, S.V., Gupta, S. (2016). p38-MAPK/MSK1-mediated overexpression of histone H3 serine 10 phosphorylation defines distance-dependent prognostic value of negative resection margin in gastric cancer. *Clin Epigenetics*. 8:88.

Khan, Z., Bisen, P.S. (2013). Oncoapoptotic signaling and deregulated target genes in cancers: special reference to oral cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1836(1):123-45.

Khandrika, L., Lieberman, R., Koul, S., Kumar, B., Maroni, P., Chandhoke, R., Meacham, R.B., Koul, H.K. (2009). Hypoxia-associated p38 mitogenactivated protein kinase-mediated androgen receptor activation and increased HIF-1 α levels contribute to emergence of an aggressive phenotype in prostate cancer. *Oncogene*. 28, 1248–1260.

Kharman-Biz, A., Gao, H., Ghiasvand, R., Zhao, C., Zendejdel, K., Dahlman-Wright, K. (2013). Expression of activator protein-1 (AP-1) family members in breast cancer. *BMC Cancer*. 13:441.

Kholodenko, B.N., Birtwistle, M.R. (2009). Four-dimensional dynamics of MAPK information processing systems. *Rev Syst Biol Med*. 1(1): 28–44.

Khor, L.Y., Bae, K., Paulus, R., Al-Saleem, T., Hammond, M.E., Grignon, D.J., Che, M., Venkatesan, V., Byhardt, R.W., Rotman, M., Hanks, G.E., Sandler, H.M., Pollack, A. (2009). MDM2 and Ki-67 predict for distant metastasis and mortality in men treated with radiotherapy and androgen deprivation for prostate cancer: RTOG 92-02. *J Clin Oncol*. 27(19):3177-84.

Kidane, D., Chae, W. J., Czochor, J., Eckert, K. A., Glazer, P.M., Bothwell, A.L.M., Sweasy, J.B. (2014). Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 49(2): 116–139.

Kierszenbaum, A.L., Tres, L. (2012). *Histología y Biología Celular*. 3^a ed. Elsevier. España.

Kim, H.H., Kuwano, Y., Srikantan, S., Lee, E.K., Martindale, J.L., Gorospe, M. (2009a). HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev.* 23(15):1743-8.

Kim, M.S., Lee, E.J., Kim, H.R., Moon, A. (2003). p38 kinase is a key signaling molecule for H-Ras-induced cell motility and invasive phenotype in human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 63(17):5454-61.

Kinkade, C.W., Castillo-Martin, M., Puzio-Kuter, A., Yan, J., Foster, T.H., Gao, H., Sun, Y., Ouyang, X., Gerald, W.L., Cordon-Cardo, C., Abate-Shen, C. (2008). Targeting AKT/mTOR and ERK MAPK signaling inhibits hormone-refractory prostate cancer in a preclinical mouse model. *J Clin Invest.* 118(9):3051-64.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14(22):5579-88.

Knauf, J.A., Ma, X., Smith, E.P., Zhang, L., Mitsutake, N., Liao, X.H., Refetoff, S., Nikiforov, Y.E., Fagin, J.A. (2005). Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res.* 65(10):4238-45.

Knudsen, K.E., Arden, K.C., Cavenee, W.K. (1998). Multiple G1 regulatory elements control the androgen-dependent proliferation of prostatic carcinoma cells. *J Biol Chem* 273:20213-22.

Ko, Y.H., Miyake, H., Behnsawy, H.M., Cheon, J., Fujisawa, M. (2014). Limited significance of activated Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway in prostate cancer progression. *Urol Int.* 93(2):146-51.

Kobayashi, T., Iwaya, K., Moriya, T., Yamasaki, T., Tsuda, H., Yamamoto, J., Matsubara, O. (2013). A simple immunohistochemical panel comprising 2 conventional markers, Ki67 and p53, is a powerful tool for predicting patient outcome in luminal-type breast cancer. *BMC Clin Pathol.* 13: 5.

Koh, C.M., Bieberich, C.J., Dang, C.V., Nelson, W.G., Yegnasubramanian, S., Angelo M. De Marzo, A.M. (2010). MYC and Prostate Cancer. *Genes Cancer.* 1(6): 617–628.

Korrodi-Gregório, L., Silva, J.V., Santos-Sousa, L., Freitas, M.J., Felgueiras, J., Fardilha, M. (2014). TGF- β cascade regulation by PPP1 and its interactors –impact on prostate cancer development and therapy. *J Cell Mol Med.* 18(4): 555–567.

Kotas, M.E., Medzhitov, R. (2015). Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell.* 160(5):816-27.

- Koul, H.K., Pal, M., Koul, S. (2013). Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes Cancer*. 4(9-10): 342–359.
- Koumakpayi, I.H., Le Page, C., Mes-Masson, A.M., Saad, F. (2010). Hierarchical clustering of immunohistochemical analysis of the activated ErbB/PI3K/Akt/NF-kappaB signalling pathway and prognostic significance in prostate cancer. *Br J Cancer*. 102:1163–1173.
- Krajewska, M., Kim, H., Kim, C., Kang, H., Welsh, K., Matsuzawa, S., Tsukamoto, M., Thomas, R.G., Assa-Munt, N., Piao, Z., Suzuki, K., Perucho, M., Krajewski, S., Reed, J.C. (2005). Analysis of apoptosis protein expression in early-stage colorectal cancer suggests opportunities for new prognostic biomarkers. *Clin Cancer Res*. 11(15):5451-61.
- Krajewska, M., Krajewski, S., Epstein, J.I., Shabaik, A., Sauvageot, J., Song, K., Kitada, S., Reed, J.C. (1996). Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol*. 148(5):1567-76.
- Kreisberg, J.I., Malik, S.N., Prihoda, T.J., Bedolla, R.G., Troyer, D.A., Kreisberg, S., Ghosh, P.M. (2004). Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 64(15):5232-6.
- Kreso, A., Dick, J.E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 14(3):275-91.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. Nomenclature Committee on Cell Death (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 16(1):3-11.
- Krstić, J., Trivanović, D., Mojsilović, S., Santibanez, J.F. (2015). Transforming Growth Factor-Beta and Oxidative Stress Interplay: Implications in Tumorigenesis and Cancer Progression. *Oxid Med Cell Longev*. 2015: 654594.
- Krtolica, A., Krucher, N.A., Ludlow, J.W. (1998). Hypoxia-induced pRB hypophosphorylation results from downregulation of CDK and upregulation of PP1 activities. *Oncogene*. 17(18):2295-304.
- Kuhn, P.H., Marjaux, E., Imhof, A., De Strooper, B., Haass, C., Lichtenthaler, S.F. (2007). Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. *J Biol Chem*. 282:11982–11995.

- Kumar, B., Sinclair, J., Khandrika, L., Koul, S., Wilson, S., Koul, H.K. (2009). Differential effects of MAPKs signaling on the growth of invasive bladder cancer cells. *Int J Oncol.* 34(6):1557-64.
- Kumar, B., Koul, S., Petersen, J., Khandrika, L., Hwa, J.S., Meacham, R.B., Wilson, S., Koul, H.K. (2010). p38 mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity. *Cancer Res.* 70(2):832-41.
- Kumar, M., Allison, D.F., Baranova, N.N., Wamsley, J.J., Katz, A.J., Bekiranov, S., Jones, D.R., Mayo, M.W. (2013). NF- κ B regulates mesenchymal transition for the induction of non-small cell lung cancer initiating cells. *PLoS One* 8:e68597.
- Kyriakis, J.M., Avruch, J. (2012). Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev.* 92(2):689-737.
- Laberge, R.M., Sun, Y., Orjalo, A.V., Patil, C.K., Freund, A., Zhou, L., Curran, S.C., Davalos, A.R., Wilson-Edell, K.A., Liu, S., Limbad, C., Demaria, M., Li, P., Hubbard, G.B., Ikeno, Y., Javors, M., Desprez, P.Y., Benz, C.C., Kapahi, P., Nelson, P.S., Campisi, J. (2015). MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol.* 17(8):1049-61.
- Labouba, I., Le Page, C., Communal, L., Kristessen, T., You, X., Péant, B., Barrès, V., Gannon, P.O., Mes-Masson, A.M., Saad, F. (2015). Potential Cross-Talk between Alternative and Classical NF- κ B Pathways in Prostate Cancer Tissues as Measured by a Multi-Staining Immunofluorescence Co-Localization Assay. *PLoS One.* 10(7):e0131024.
- Lacombe, L., Maillette, A., Meyer, F., Veilleux, C., Moore, L., Fradet, Y. (2001). Expression of p21 predicts PSA failure in locally advanced prostate cancer treated by prostatectomy. *Int J Cancer.* 95(3):135-9.
- Laitinen, S., Martikainen, P.M., Tolonen, T., Isola, J., Tammela, T.L., Visakorpi, T. (2008). EZH2, Ki-67 and MCM7 are prognostic markers in prostatectomy treated patients. *Int J Cancer.* 122(3):595-602.
- Lakhani, S.A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G.A. Jr, Booth, C.J., Mehal, W.Z., Inayat, I., Flavell, R.A. (2006). Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science.* 311(5762):847-51.
- Lal, A., Navarro, F., Maher, C.A., Maliszewski, L.E., Yan, N., O'Day, E., Chowdhury, D., Dykxhoorn, D.M., Tsai, P., Hofmann, O., Becker, K.G., Gorospe, M., Hide, W., Lieberman, J. (2009). miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other

cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. *Mol Cell*. 35(5):610-25.

Lara, P.C., Sáez-Bravo, M.L. (2012). Principios generales del cáncer. Arán Capítulo 1, pag 28.

Lau, E., Ronai, Z.A. (2012). ATF2 - at the crossroad of nuclear and cytosolic functions. *J Cell Sci*. 125(Pt 12):2815-24.

Lee, M.K., Pardoux, C., Hall, M.C., Lee, P.S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S.M., Derynck, R. (2007). TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J*. 26(17):3957-67.

Lee, W., Mitchell, P., Tjian, R. (1987). Purified transcription factor AP1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell*. 49:741-752.

Leicht, D.T., Balan, V., Kaplun, A., Singh-Gupta, V., Kaplun, L., Dobson, M., Tzivion, G. (2007). Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1773(8):1196-212.

León, X., Bothe, C., García, J., Parreño, M., Alcolea, S., Quer, M., Vila, L., Camacho, M. (2015). Expression of IL-1 α correlates with distant metastasis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 6(35):37398-409.

Leopizzi, M., Cocchiola, R., Milanetti, E., Raimondo, D., Politi, L., Giordano, C., Scandurra, R., Scotto, d'Abusco, A. (2017). IKK α inhibition by a glucosamine derivative enhances Maspin expression in osteosarcoma cell line. *Chem Biol Interact*. 262:19-28.

Lessard, L., Bégin, L.R., Gleave, M.E., Mes-Masson, A.M., Saad, F. (2005). Nuclear localisation of nuclear factor-kappaB transcription factors in prostate cancer: an immunohistochemical study. *Br J Cancer*. 93(9):1019-23.

Levens, D. (2010). You Don't Muck with MYC. *Genes Cancer*. 1(6):547-554.

Levidou, G., Saetta, A.A., Gigelou, F., Karlou, M., Papanastasiou, P., Stamatelli, A., Kavantzias, N., Michalopoulos, N.V., Agrogiannis, G., Patsouris, E., Korkolopoulou, P. (2012). ERK/pERK expression and B-raf mutations in colon adenocarcinomas: correlation with clinicopathological characteristics. *World J Surg Oncol*. 29;10:47.

Li, K., Chen, M.K., Situ, J., Huang, W.T., Su, Z.L., He, D., Gao, X. (2013). Role of co-expression of c-Myc, EZH2 and p27 in prognosis of prostate cancer patients after surgery. *Chin Med J (Engl)*. 126(1):82-7.

- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91(4):479-89.
- Li, W., Marshall, C., Mei, L., Dzubow, L., Schmults, C., Dans, M., Seykora, J. (2005). Srcasm modulates EGF and Src-kinase signaling in keratinocytes. *J Biol Chem*. 280(7):6036-46.
- Li, X.Y., Green, M.R. (1996). Intramolecular inhibition of activating transcription factor-2 function by its DNA-binding domain. *Genes Dev*. 10(5):517-27.
- Li, Z., Owonikoko, T.K., Sun, S.Y., Ramalingam, S.S., Doetsch, P.W., Xiao, Z.Q., Khuri, F.R., Curran, W.J., Deng, X. (2012). c-Myc suppression of DNA double-strand break repair. *Neoplasia*. 14(12):1190-202.
- Liang, H., Liu, T., Chen, F., Liu, Z., Liu, S. (2011). A full-length 3D structure for MAPK/ERK kinase 2 (MEK2). *Sci China Life Sci*. 54(4):336-41.
- Liao, D.J., Dickson, R.B. (2000). c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 7(3):143-64.
- Liao, Y., Hung, M.C. (2010) Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am J Transl Res*. 2(1):19-42.
- Lilja, H., Ulmert, D., Vickers, A.J. (2008). Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer*. 8, 268-278.
- Lin, D.L., Whitney, M.C., Yao, Z., Keller, E.T. (2001). Interleukin-6 induces androgen responsiveness in prostate cancer cells through up-regulation of androgen receptor expression. *Cancer Res*. 7, 1773–1781.
- Lin, H.X., Qiu, H.J., Zeng, F., Rao, H.L., Yang, G.F., Kung, H.F., Zhu, X.F., Zeng, Y.X., Cai, M.Y., Xie, D. (2013). Decreased expression of Beclin 1 correlates closely with Bcl-xL expression and poor prognosis of ovarian carcinoma. *PLoS One*. 8(4):e60516.
- Lin-Tsai, O., Clark, P.E., Miller, N.L., Fowke, J.H., Hameed, O., Hayward, S.W., Strand, D.W. (2014). Surgical intervention for symptomatic benign prostatic hyperplasia is correlated with expression of the AP-1 transcription factor network. *Prostate*. 74(6):669-79.
- Liu, H., Deng, X., Shyu, Y.J., Li, J.J., Taparowsky, E.J., Hu, C.D. (2006). Mutual regulation of c-Jun and ATF2 by transcriptional activation and subcellular localization. *EMBO J*. 25(5): 1058–1069.

- Liu H, Yang J, Yuan Y, Xia Z, Chen M, Xie L., Ma, X., Wang, J., Ouyang, S., Wu Q., Yu, F., Zhou, X., Yang, Y., Cao, Y., Hu, J. Yin, B. (2014). Regulation of Mcl-1 by constitutive activation of NF- κ B contributes to cell viability in human esophageal squamous cell carcinoma cells. *BMC Cancer*. 14:98.
- Liu, R.Y., Fan, C., Liu, G., Olashaw, N.E., Zuckerman, K.S. (2000). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for tumor necrosis factor-alpha -supported proliferation of leukemia and lymphoma cell lines. *J Biol Chem*. 275(28):21086-93.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 86(1):147-57.
- Lochrin, E.S., Figg, W.D., Finn, S.P. (2015). Enzalutamide for treatment of CRPC: rationale for sequencing and potential clinical biomarker for resistance. *Cancer Bio Ther*. 16(2):201-3.
- Lopez-Bergami, P., Lau, E., Ronai, Z. (2010). Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat Rev Cancer*. 10(1): 65–76.
- Lorenzen, I., Lokau, J., Dusterhoft, S., Trad, A., Garbers, C., Scheller, J., Rose-John, S., Grotzinger, J. (2012). The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Lett*. 586:1093–1100.
- Lorenzo, G., Tortora, D.G., D’Armiento, F.P., Rosa, G., Staibano, D., Autorino, S., D’Armiento, R.M., De Laurentiis, M., De Placido, S., Catalano, G., Bianco, A.R., Ciardiello, F. (2002). Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgenindependence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 8:3438–3444.
- Lotan, T.L., Lyon, M., Huo, D., Taxy, J.B., Brendler, C., Foster, B.A., Stadler, W., Rinker-Schaeffer, C.W. (2007). Up-regulation of MKK4, MKK6 and MKK7 during prostate cancer progression: an important role for SAPK signalling in prostatic neoplasia. *J Pathol*. 212(4):386-94.
- Luo, J-L., Tan, W., Ricono, J.M., Korchynskiy, O., Zhang, M., Gonias, S.L., Cheresch, D.A., Karin, M. (2007). Nuclear cytokine-activated IKK α controls prostate cancer metastasis by repressing Masp1. *Nature*. 446:690–694.
- Luo, Y., Hurwitz, J., Massagué, J. (1995). Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature*. 375(6527):159-61.

Maekawa, T., Jin, W., Ishii, S. (2010). The Role of ATF-2 Family Transcription Factors in Adipocyte Differentiation: Antiobesity Effects of p38 Inhibitors. *Mol Cell Biol.* 30(3): 613–625.

Maekawa, T., Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Sudo, T., Yoshimura, T., Fujisawa, J., Yoshida, M., Ishii, S. (1989). Leucine zipper structure of the protein CRE-BP1 binding to the cyclic AMP response element in brain. *EMBO J.* 8(7):2023-8.

Maia, F.F., Vassallo, J., Pinto, G.A., Pavin, E.J., Matos, P.S., Zantut-Wittmann, D.E. (2016). Expression of Mcl-1 and Ki-67 in papillary thyroid carcinomas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 124(04):209-214.

Makarewicz, R., Zyromska, A., Andrusiewicz, H. (2011). Comparative analysis of biological profiles of benign prostate and prostate cancer as potential diagnostic, prognostic and predictive indicators. *Folia Histochem Cytobiol.* 49(3): 452-457.

Malik, S.N., Brattain, M., Ghosh, P.M., Troyer, D.A., Prihoda, T., Bedolla, R., Kreisberg, J.I. (2002). Immunohistochemical demonstration of phospho-Akt in high Gleason grade prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 8(4):1168-71.

Malumbres, M., Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer.* 1(3):222-31.

Marker, P.C., Donjacour, A.A., Dahiya, R. y Cunha, G.R. (2003). Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol.* 253, 165-174.

Marks, J.L., Gong, Y., Chitale, D., Golas, B., McLellan, M.D., Kasai, Y., Ding, L., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Solit, D., Levine, R., Michel, K., Thomas, R.K., Rusch, V.W., Ladanyi, M., Pao, W. (2008). Novel MEK1 mutation identified by mutational analysis of epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 68(14):5524-8.

Massagué, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell.* 134(2):215-30.

Matsuo, Y., Sawai, H., Ma, J., Xu, D., Ochi, N., Yasuda, A., Takahashi, H., Funahashi, H., Takeyama, H. (2009). IL-1alpha secreted by colon cancer cells enhances angiogenesis: the relationship between IL-1alpha release and tumor cells' potential for liver metastasis. *J Surg Oncol.* 99(6):361-7.

McCall, P., Bennett, L., Ahmad, I., Mackenzie, L.M., Forbes, I.W., Leung, H.Y., Sansom, O.J., Orange, C., Seywright, M., Underwood, M.A., Edwards, J. (2012). NFκB signalling is upregulated in a subset of castrate-resistant prostate cancer patients and correlates with disease progression. *Br J Cancer.* 107(9):1554-63.

McCall, P., Gemmell, L.K., Mukherjee, R., Bartlett, J.M., Edwards, J. (2008). Phosphorylation of the androgen receptor is associated with reduced survival in hormone-refractory prostate cancer patients. *Br J Cancer*. 98(6):1094-101.

McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Abrams, S.L., Lee, J.T., Chang, F., Bertrand, F.E., Navolanic, P.M., Terrian, D.M., Franklin, R.A., D'Assoro, A.B., Salisbury, J.L., Mazzarino, M.C., Stivala, F., Libra, M. (2006). Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul*. 46:249-79.

McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A.M., Franklin, R.A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 1773(8):1263-84.

McDonald, A., Habib, F.K. (1992). Divergent responses to epidermal growth factor in hormone sensitive and insensitive human prostate cancer cell lines. *Br J Cancer*. 65:177-182.

McNeal, J.E. (1972). The prostate and prostatic urethra: a morphologic synthesis. *J Urol*. 107(6):1008-16.

McNeal, J. E. (1978). Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest. Urol*. 15:340-5.

McNeal, J.E. (1981). Normal and pathologic anatomy of prostate. *Urology*. 17: 11-16.

McNeal, J.E. (1990). Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. *Urol Clin North Am*. 17:477-486.

Meulmeester, E., Ten Dijke, P. (2011). The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J Pathol*. 223(2):205-18.

Miller, D.M., Thomas, S.D., Islam, A., Muench, D., Sedoris, K. (2012). c-Myc and Cancer Metabolism. *Clin Cancer Res*. 18(20): 5546-5553.

Mills, J.R., Hippo, Y., Robert, F., Chen, S.M., Malina, A., Lin, C.J., Trojahn, U., Wendel, H.G., Charest, A., Bronson, R.T., Kogan, S.C., Nadon, R., Housman, D.E., Lowe, S.W., Pelletier, J. (2008). mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(31):10853-8.

Mimeault, M. Batra, S.K. (2011). Animal models relevant to human prostate carcinogenesis underlining the critical implication of prostatic stem/progenitor cells. *Biochim Biophys Acta*. 1816(1):25-37.

Miyake, H., Muramaki, M., Kurahashi, T., Takenaka, A., Fujisawa, M. (2010). Expression of potential molecular markers in prostate cancer: correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. *Urol Oncol*. 2010 28(2):145-51.

Mo, Y., Vaessen, B., Johnston, K., Marmorstein, R. (2000). Structure of the elk-1-DNA complex reveals how DNA-distal residues affect ETS domain recognition of DNA. *Nat Struct Biol*. 7(4):292-7.

Moore, R.J., Wilson, J.D. (1973). The effect of androgenic hormones on the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate:delta-4-3-ketosteroid 5 alpha-oxidoreductase of rat ventral prostate. *Endocrinology*. 93(3):581-92.

Moravcikova, E., Krepela, E., Prochazka, J., Benkova, K., Pauk, N. (2014). Differential sensitivity to apoptosome apparatus activation in non-small cell lung carcinoma and the lung. *Int. J. Oncol*. 44, 5, pp: 1443-1454.

Moreira, D.M., Bostwick, D.G., Andriole, G.L., Peterson, B.L., Cohen, H.J., Castro-Santamaria, R., Freedland, S.J. (2015). Baseline Prostate Atrophy is Associated with Reduced Risk of Prostate Cancer in Men Undergoing Repeat Prostate Biopsy. *J Urol*. 194(5):1241-6.

Morris, J.F., Sul, J.Y., Kim, M.S., Klein-Szanto, A.J., Schochet, T., Rustgi, A., Eberwine, J.H. (2013). Elk-1 phosphorylated at threonine-417 is present in diverse cancers and correlates with differentiation grade of colonic adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2013 May; 44(5): 766–776.

Moschetta, M., Reale, A., Marasco, C, Vacca, A., M R Carratù, M.R. (2014). Therapeutic targeting of the mTOR-signalling pathway in cancer: benefits and limitations *Br J Pharmacol*. 171(16): 3801–3813.

Moses, H.L. (1992). TGF-beta regulation of epithelial cell proliferation. *Mol Reprod Dev*. 32(2):179-84.

Motyl, T., Grzelkowska, K., Zimowska, W., Skierski, J., Wareski, P., Płoszaj, T., Trzeciak, L. (1998). Expression of bcl-2 and bax in TGF-beta 1-induced apoptosis of L1210 leukemic cells. *Eur J Cell Biol*. 75(4):367-74.

Muellner, M.K., Uras, I.Z., Gapp, B.V., Kerzendorfer, C., Smida, M., Lechtermann, H., Craig-Mueller, N., Colinge, J., Duernberger, G., Nijman, S.M. (2011). A chemical-genetic

screen reveals a mechanism of resistance to PI3K inhibitors in cancer. *Nat Chem Biol.* 7(11):787-93.

Mukherjee, R., Bartlett, J.M., Krishna, N.S., Underwood, M.A., Edwards, J. (2005). Raf-1 expression may influence progression to androgen insensitive prostate cancer. *Prostate.* 64(1):101-7.

Mustea, A., Pirvulescu, C., Könsgen, D., Braicu, EI., Yuan, S., Sun, P., Lichtenegger, W., Sehouli, J. (2008). Decreased IL-1 RA concentration in ascites is associated with a significant improvement in overall survival in ovarian cancer. *Cytokine.* 42(1):77-84.

Murugan, A.K., Dong, J., Xie, J., Xing, M. (2009). MEK1 mutations, but not ERK2 mutations, occur in melanomas and colon carcinomas, but none in thyroid carcinomas. *Cell Cycle.* 8(13):2122-4.

Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., Dixit, V.M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell.* 85(6):817-27.

Nagadoi, A., Nakazawa, K., Uda, H., Okuno, K., Maekawa, T., Ishii, S., Nishimura, Y. (1999). Solution structure of the transactivation domain of ATF-2 comprising a zinc finger-like subdomain and a flexible subdomain. *J Mol Biol.* 287(3):593-607.

Nagle, R.B., Ahmann, F.R., McDaniel, K.M., Paquin, M.L., Clark, V.A. y Celniker, A. (1987). Cytokeratin characterization of human prostatic carcinoma and its derived cell lines. *Cancer Res.* 47, 281-286.

Naito, M., Vongsa, S., Tsukune, N., Ohashi, A., Takahashi, T. (2015). Promyelocytic leukemia zinc finger mediates glucocorticoid-induced cell cycle arrest in the chondroprogenitor cell line ATDC5. *Mol Cell Endocrinol.* 417:114-23.

Nakashima, J., Tachibana, M., Horiguchi, Y., Oya, M., Ohigashi, T., Asakura, H., Murai, M. (2000). Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 6(7):2702-6.

Nariculam, J., Freeman, A., Bott, S., Munson, P., Cable, N., Brookman-Amisshah, N., Williamson, M., Kirby, R.S., Masters, J., Feneley, M. (2009). Utility of tissue microarrays for profiling prognostic biomarkers in clinically localized prostate cancer: the expression of BCL-2, E-cadherin, Ki67 and p53 as predictors of biochemical failure after radical prostatectomy with nested control for clinical and pathological risk factor. *Asian J Androl.* 11:109-118.

- Navdaev, A., Eble, J.A. (2011). Components of cell-matrix linkage as potential new markers for prostate cancer. *Cancer*. 3:883-896.
- Nguyen, D.P., Li, J., Yadav, S.S., Tewari, A.K. (2014). Recent insights into NF- κ B signalling pathways and the link between inflammation and prostate cancer. *BJU Int*. 114(2):168-76.
- Nicholson, T.M., Ricke, E.A., Marker, P.C., Miano, J.M., Mayer, R.D., Timms, B.G., Vom Saal, F.S., Wood, R.W., Ricke, W.A. (2012). Testosterone and 17beta-Estradiol Induce Glandular Prostatic Growth, Bladder Outlet Obstruction, and Voiding Dysfunction in Male Mice. *Endocrinology*. 153(11):5556-65.
- Nomura, N., Zu, Y.L., Maekawa, T., Tabata, S., Akiyama, T., Ishii, S. (1993). Isolation and characterization of a novel member of the gene family encoding the cAMP response element-binding protein CRE-BP1. *J Biol Chem*. 268(6):4259-66.
- Norman, J.T., Cunha, G.R., Sugimura, Y. (1986). The induction of new ductal growth in adult prostatic epithelium in response to an embryonic prostatic inductor. *Prostate*. 8(3):209-20.
- Nupponen, N.N., Kakkola, L., Koivisto, P., Visakorpi, T. (1998). Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am J Pathol* (1998) 153(1):141–810.
- Obaya, A.J., Mateyak, M.K., Sedivy, J.M. (1999). Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene*. 18(19):2934-4.
- Ogawara, Y., Kishishita, S., Obata, T., Isazawa, Y., Suzuki, T., Tanaka, K., Masuyama, N., Gotoh, Y. (2002). Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem*. 277(24):21843-50.
- Ohren, J.F., Chen, H., Pavlovsky, A., Whitehead, C., Zhang, E., Kuffa, P., Yan, C., McConnell, P., Spessard, C., Banotai, C., Mueller, W.T., Delaney, A., Omer, C., Sebolt-Leopold, J., Dudley, D.T., Leung, I.K., Flamme, C., Warmus, J., Kaufman, M., Barrett, S., Teclé, H., Hasemann, C.A. (2004). Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol*. 11(12):1192-7.
- Ojea Calvo A., Mosteiro Cerviño, M.J., Domínguez Freire, F., Alonso Rodrigo, A., Rodríguez Iglesias, B., Benavente Delgado, J., Barros Rodríguez, J.M., González Piñeiro, A. (2004). Factores pronósticos del cáncer de próstata: utilidad de la expresión del Ki67 en las biopsias preoperatorias. *Arch. Esp. Urol*. 57, 8 (805-816).

Okamoto, M., Oyasu, R. (1996). Effect of transfected interleukin-6 in non-tumorigenic and tumorigenic rat urothelial cell lines. *Int J Cancer*. 68(5):616–621.

Okutur, K., Bassulu, N., Dalar, L., Aydin, K., Bozkurt, M., Pilanci, K.N., Dogusoy, G.B., Tecimer, C., Mandel, N.M., Demir, G. (2015), Predictive and prognostic significance of p27, Akt, PTEN and PI3K expression in HER2-positive metastatic breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 16(7):2645-51.

Oliveira, A., Dinis-Oliveira, R.J., Nogueira, A., Gonçalves, F., Silva, P., Vieira, C., Silvestre, R., Carvalho, F., Medeiros, R. (2014). Interleukin-1 β genotype and circulating levels in cancer patients: metastatic status and pain perception. *Clin Biochem*. 47(13-14):1209-13.

Olsson, M., Zhivotovsky, B. (2011). Caspases and cancer. *Cell Death Differ*. 18(9):1441-9.

Otto, K.B., Acharya, S.S., Robinson, V.L. (2012). Stress-activated kinase pathway alteration is a frequent event in bladder cancer. *Urol Oncol*. 30(4):415-20.

Ow, Y.P., Green, D.R., Hao, Z., Mak, T.W. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(7):532-42.

Ozawa, K., Sudo, T., Soeda, E., Yoshida, M.C., Ishii, S. (1991). Assignment of the human CREB2 (CRE-BP1) gene to 2q32. *Genomics*. 10:1103–1104.

Ozbek, E., Aliskan, T., Otunctemur, A., Calik, G., Cakir, S., Dursun, M., Somay, A. (2012). Comparison of tumor grade and stage with nuclear factor kappa b and p38 mitogene activated protein kinase expressions in renal cell cancer. *Arch Ital Urol Androl*. 84(2):53-60.

Ozbek, E., Otunctemur, A., Calik, G., Aliskan, T., Cakir, S., Dursun, M., Somay, A. (2011). Comparison of p38MAPK (mitogene activated protein kinase), p65 NFkappaB (nuclear factor kappa b) and EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) expressions with tumor grade and stage of superficial and invasive bladder tumors. *Arch Ital Urol Androl*. 83(4):181-7.

Padua, D., Massagué, J. (2009). Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res*. 19(1):89-102.

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

- Panal Cusatia, M., Herrera de la Muela, M., Hardisson Hernaezb, D., Choqueneira Dionisioa, M., Román Guindoa, A., de Santiago Garcia, F.J. (2014). Correlation between Ki67 expression and classical prognostic and predictive factors in early breast cancer. *Rev Senol Patol Mamar*. 27(4):163-169.
- Park, J.I., Lee, M.G., Cho, K., Park, B.J., Chae, K.S., Byun, D.S., Ryu, B.K., Park, Y.K., Chi, S.G. (2003). Transforming growth factor-beta1 activates interleukin-6 expression in prostate cancer cells through the synergistic collaboration of the Smad2, p38-NF-kappaB, JNK, and Ras signaling pathways. *Oncogene*. 22(28):4314-32.
- Parray, A.A., Baba, R.A., Bhat, H.F., Wani, L., Mokhdomi, T.A., Mushtaq, U., Bhat, S.S., Kirmani, D., Kuchay, S., Wani, M.M., Khanday, F.A. (2014). MKK6 is upregulated in human esophageal, stomach, and colon cancers. *Cancer Invest*. 32(8):416-22.
- Parsons, M.J., Green, D.R. (2010). Mitochondria in cell death. *Essays Biochem*. 47:99-114.
- Pasche, B. (2001). Role of transforming growth factor beta in cancer. *J Cell Physiol*. 186(2):153-68.
- Peng, S.L., Yao, D.B., Zhao, Y., Xu, F., Jia, C.J., Xu, Y.Q., Dai, C.L. (2015). Prognostic value of PUMA expression in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 19(1):38-44.
- Pénzváltó, Z., Lánckzy, A., Lénárt, J., Meggyesházi, N., Krenács, T., Szoboszlai, N., Denkert, C., Pete, I., Gyórfy, B. (2014). MEK1 is associated with carboplatin resistance and is a prognostic biomarker in epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer*. 14:837.
- Peraldo-Neia, C., Migliardi, G., Mello-Grand, M., Montemurro, F., Segir, R., Pignochino, Y., Cavalloni, G., Torchio, B., Mosso, L., Chiorino, G., Aglietta, M. (2011). Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutation analysis, gene expression profiling and EGFR protein expression in primary prostate cancer. *BMC Cancer*. 11:31.
- Perlman, R., Schiemann, W.P., Brooks, M.W., Lodish, H.F., Weinberg, R.A. (2001). TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol*. 3(8):708-14.
- Persengiev, S.P., Green, M.R. (2003). The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis. *Apoptosis*. 8(3):225-8.
- Petrescu, A., Mârzan, L., Codreanu, O., Niculescu, L. (2006). Immunohistochemical detection of p53 protein as a prognostic indicator in prostate carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 47(2):143-6.

Pienta, K.J., Bradley, D. (2006). Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 12:1665-1671.

Pierorazio, P.M., Walsh, P.C., Partin, A.W., Epstein, J.I. (2013). Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU Int.* 111(5):753-60.

Pinkas, J., Leder, P. (2002). MEK1 signaling mediates transformation and metastasis of EpH4 mammary epithelial cells independent of an epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Res.* 62(16):4781-90.

Plati, J., Bucur, O., Khosravi-Fara, R. (2011). Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol (Camb).* 3(4): 279–296.

Polascik, T.J., Oesterling, J.E., Partin, A.W. (1999). Prostate specific antigen: a decade of discovery--what we have learned and where we are going. *J Urol.* 162(2):293-306.

Pollack, A., DeSilvio, M., Khor, L.Y., Li, R., Al-Saleem, T.I., Hammond, M.E., Venkatesan, V., Lawton, C.A., Roach, M. 3rd, Shipley, W.U., Hanks, G.E., Sandler, H.M. (2004). Ki-67 staining is a strong predictor of distant metastasis and mortality for men with prostate cancer treated with radiotherapy plus androgen deprivation: Radiation Therapy Oncology Group Trial 92-02. *J Clin Oncol.* 22(11):2133-40.

Pontuga, L.A., Gregory, C.W., French, F.S., Wilson, E.M. (2008). Site-specific androgen receptor serine phosphorylation linked to epidermal growth factor-dependent growth of castration-recurrent prostate cancer. *J Biol Chem.* 283:20989-21001.

Powers, G.L., Marker, P.C. (2013). Recent advances in prostate development and links to prostatic diseases. *NIH Public Access. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 5(2): 243–256.

Prendergast, G.C. (1999). Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene.* 18(19):2967-87.

Principe, D.R., Doll, J.A., Bauer, J., Jung, B., Munshi, H.G., Bartholin, L., Pasche, B., Lee, C., Paul J. Grippo, P.J. (2014). TGF- β : Duality of Function Between Tumor Prevention and Carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 106(2): djt369.

Qiu, W., Carson-Walter, E.B., Kuan, S.F., Zhang, L., Yu, J. (2009). PUMA suppresses intestinal tumorigenesis in mice. *Cancer Res.* 69(12):4999-5006.

Rahman, M.T., Nakayama, K., Rahman, M., Katagiri, H., Katagiri, A., Ishibashi, T., Ishikawa, M., Sato, E., Iida, K., Nakayama, N., Ishikawa, N., Miyazaki, K. (2013). KRAS and MAPK1 gene amplification in type II ovarian carcinomas. *Int J Mol Sci.* 14(7):13748-62.

- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., Davis, R.J. (1995). Proinflammatory cytokines and environmental stress cause p38 MAPKinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem.* 270, pp: 7420-7426.
- Ramirez-Gracia, M.A., Márquez-Gonzalez, H., Barranco-Lampón, G., López-Aguilar, J.E. (2014). Bcl-2: su papel en el ciclo celular, apoptosis y cáncer. *El Residente.* 9, 3, pp: 84-94.
- Rao, V.N., Reddy, E.S. (1994). Elk-1 proteins interact with MAP kinases. *Oncogene.* 9(7):1855-60.
- Raymond, A., Clarke, H.J., Schirra, J. W., Catto, M.F., Lavin, R.A., Gardiner. (2010). *Markers for Detection of Prostate Cancer Cancers (Basel).* 2(2): 1125–1154.
- Reis, S.T., Pontes-Júnior, J., Antunes, A.A., Sousa-Canavez, J.M., Abe, D.K., Cruz, J.A., Dall'oglio, M.F., Crippa, A., Passerotti, C.C., Ribeiro-Filho, L.A., Viana, N.I., Srougi, M., Leite, K.R. (2011). TGF-B1 expression as a biomarker of poor prognosis in prostate cancer. *Clinics (Sao Paulo)* 66:1143-7.
- Ren, B.X., Ji, Y., Tang, J.C., Sun, D.P., Hui, X., Yang, D.Q., Zhu, X.L. (2015). Effect of Tanshinone IIA intrathecal injections on pain and spinal inflammation in mice with bone tumors. *Genet Mol Res.* 14(1):2133-8.
- Renault, T.T., Chipuk, J. E. (2014). Getting away with murder: how do the BCL-2 family of proteins kill with immunity? *Ann N Y Acad Sci.* 1285(1): 59–79.
- Ribeiro, F.R., Henrique, R., Martins, A.T., Jerónimo, C., Teixeira, M.R. (2007). Relative copy number gain of MYC in diagnostic needle biopsies is an independent prognostic factor for prostate cancer patients. *Eur Urol.* 52(1):116-25.
- Richardson, E., Uglehus, R.D., Due, J., Busch, C., Busund, L.T. (2010). COX-2 is overexpressed in primary prostate cancer with metastatic potential and may predict survival. A comparison study between COX-2, TGF-beta, IL-10 and Ki67. *Cancer Epidemiol.* 34(3):316-22.
- Richardson, G.D., Robson, C.N., Lang, S.H., Neal, D.E., Maitland, N.J. y Collins, A.T. (2004). CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci.* 117, 3539-3545.
- Ricote, M., Garcia-Tuñon, I., Bethencourt, F.R., Fraile, B., Paniagua, R., Royuela, M. (2004). Interleukin-1 (IL-1 α and IL-1B) and its receptors (IL-1RI, IL-1RII, and IL-1Ra) in prostate carcinoma. *Cancer.* 100:1388–96.

Ricote, M., García-Tuñón, I., Bethencourt, F., Fraile, B., Onsurbe, P., Paniagua, R., Royuela, M. (2006). The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia. *J Pathol.* 208(3):401-7.

Rider, P., Carmi, Y., Voronov, E., Apte, R.N. (2013). Interleukin-1 α . *Semin Immunol.* 25(6):430-8.

Rigaud, J., Tiguert, R., Decobert, M., Hovington, H., Latulippe, E., Laverdiere, J., Larue, H., Lacombe, L., Fradet, Y. (2004). Expression of p21 cell cycle protein is an independent predictor of response to salvage radiotherapy after radical prostatectomy. *Prostate.* 58(3):269-76.

Robbins y Cotran. (2010). *Patología Estructural y Funcional.* Elsevier Saunders. España, s.

Roberts, A.B., Wakefield, L.M. (2003). The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(15):8621-3.

Roberts, P.J., Der, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene.* 26(22):3291-310.

Rodríguez-Berriguete, G., Fraile, B., de Bethencourt, F.R., Prieto-Folgado, A., Bartolome, N., Nuñez, C., Prati, B., Martínez-Onsurbe, P., Olmedilla, G., Paniagua, R., Royuela, M. (2010). Role of iaps in prostate cancer progression: Immunohistochemical study in normal and pathological (benign hyperplastic, prostatic intraepithelial neoplasia and cancer) human prostate. *BMC Cancer.* 10:18.

Rodríguez-Berriguete, G., Fraile, B., Martínez-Onsurbe, P., Olmedilla, G., Paniagua, R., Royuela, M. (2012). MAP Kinases and Prostate Cancer. *J Signal Transduct.* 169170.

Rodríguez-Berriguete, G., Sánchez-Espiridión, B., Cansino, J.R., Olmedilla, G., Martínez-Onsurbe, P., Sánchez-Chapado, M., Paniagua, R., Fraile, B., Royuela, M. (2013). Clinical significance of both tumor and stromal expression of components of the IL-1 and TNF- α signaling pathways in prostate cancer. *Cytokine.* 64(2):555-63.

Rodríguez-Berriguete, G., Torrealba, N., Fraile, B., Ricardo Paniagua, R., Royuela, M. (2016). Epidermal growth factor induces p38 MAPK-dependent G0/G1-to-S transition in prostate cancer cells upon androgen deprivation conditions. *Growth Factors.* 34,1-2,5-10.

Rodríguez-Berriguete, G., Torrealba, N., Ortega, M.A., Martínez-Onsurbe, P., Olmedilla, G., Paniagua, R., Guil-Cid, M., Fraile, B., Royuela, M. (2015). Prognostic value of inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) and caspases in prostate cancer: caspase-3 forms and XIAP predict biochemical progression after radical prostatectomy. *BMC Cancer.* 15:809.

Roninson, I.B. (2002). Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett.* 179(1):1-14.

Roovers, K., Assoian, R.K. (2000). Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays.* 22(9):818-26.

Rose-John, S. (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci.* 8(9):1237-47.

Ross, J.S., Kallakury, B.V., Sheehan, C.E., Fisher, H.A., Kaufman, R.P., Kaur, P. Jr, Kaur, P., Gray, K., Stringer, B. (2004). Expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha proteins in prostatic adenocarcinomas: correlation of nuclear factor-kappa B immunoreactivity with disease recurrence. *Clin Cancer Res.* 10:2466–2472.

Royuela, M., De Miguel, M.P., Bethencourt, F.R., Sanchez-Chapado, M., Fraile, B., Paniagua, R. (1998). Transforming growth factor B 1 and its receptor types I and II. Comparison in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma. *Growth Factors.* 16:101-10.

Royuela, M., Arenas, M.I., Bethencourt, F.R., Sanchez-Chapado, M., Fraile, B., Paniagua, R. (2001). Immunoexpressions of p21, Rb, mcl-1 and bad gene products in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostates. *Eur cytokine Netw.* 12, 4, pp: 654-663.

Royuela, M., Arenas, M.I., Bethencourt, F.R., Sánchez-Chapado, M., Fraile, B., Paniagua, R. (2002). Regulation of proliferation/apoptosis equilibrium by mitogen-activated protein kinases in normal, hyperplastic, and carcinomatous human prostate. *Hum Pathol.* 33(3):299-306.

Royuela, M., Rodríguez-Berriguete, G., Fraile, B., Paniagua, R. (2008). TNF-alpha/IL-1/NF-kappaB transduction pathway in human cancer prostate. *Histol Histopathol.* 23:1279-90.

Rybak, A.P., Bristow, R.G., Kapoor, A. (2015). Prostate cancer stem cells: deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. *Oncotarget.* 6(4): 1900–1919.

Saal, L.H., Johansson, P., Holm, K., Gruvberger-Saal, S.K., She, Q.B., Maurer, M., Koujak, S., Ferrando, A.A., Malmström, P., Memeo, L., Isola, J., Bendahl, P.O., Rosen, N., Hibshoosh, H., Ringnér, M., Borg, A., Parsons, R. (2007). Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(18):7564-9.

- Sabio, G., Roger J. Davis, R.J. (2014). TNF and MAP kinase signaling pathways. *Semin Immunol.* 26(3): 237–245.
- Sacks, D.B. (2006). The role of scaffold proteins in MEK/ERK signalling. *Biochem Soc Trans.* 34(Pt 5):833-6.
- Sadler, T.W. (2012). *Embriología médica*. Ed. ThePoint, 12ª edición. Lagman. 240 – 241.
- Saigo, K., Yoshida, K., Ikeda, R., Sakamoto, Y., Murakami, Y., Urashima, T., Asano, T., Kenmochi, T., Inoue, I. (2008). Integration of hepatitis B virus DNA into the myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (MLL4) gene and rearrangements of MLL4 in human hepatocellular carcinoma. *Hum Mutat.* 29(5):703-8.
- Sakamaki, K., Satou, Y. (2009). Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *J Fish Biol.* 74(4): 727–753.
- Sakr, W.A., Wheeler, T.M., Blute, M., Bodo, M., Calle-Rodrigue, R., Henson, D.E., Mostofi, F.K., Seiffert, J., Wojno, K., Zincke, H. (1996). Staging and reporting of prostate cancer--sampling of the radical prostatectomy specimen. *Cancer.* 78(2): 366-368.
- Salghetti, S.E., Kim, S.Y., Tansey, W.P. (1999). Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *EMBO J.* 18(3):717-26.
- Salm, S., Burger, P.E., Wilson, E.L. (2012) TGF- β and stem cell factor regulate cell proliferation 14 in the proximal stem cell niche. *Prostate.* 72:998-1005.
- Sampson, V.B., Rong, N.H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N.J., Dunn, S.P., Krueger, L.J. (2007). MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* 67(20):9762-70.
- Sánchez-Elsner, T., Botella, L.M., Velasco, B., Corbí, A., Attisano, L., Bernabéu, C. (2001). Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem.* 276(42):38527-35.
- Sano, Y., Harada, J., Tashiro, S., Gotoh-Mandeville, R., Maekawa, T., Ishii, S. (1999). ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.* 274(13):8949-57.
- Santer, F., Malinowska, M., Culig, Z., Cavarretta, I.T. (2010). Interleukin-6 trans-signalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 17(1): 241–253.

Sanz, S., Martinez, J.M., Boronat, F., Martinez, M., Jimenez, J.F. (1996). Factors influencing variability of PSA blood concentration in patients with prostate benign hyperplasia. *Actas Urol Esp.* 20, 867-872.

Sasor, A., Wagrowska-Danilewicz, M., Danilewicz, M. (2000). Ki-67 antigen and P53 protein expression in benign and malignant prostatic lesions. Immunohistochemical quantitative study. *Pol J Pathol.* 51(1):31-6.

Sato, K., Qian, J., Slezak, J.M., Lieber, M.M., Bostwick, D.G., Bergstralh, E.J., Jenkins, R.B. (1999). Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 91(18):1574-80.

Sauer, L., Gitenay, D., Vo, C., Baron, V.T. (2010). Mutant p53 initiates a feedback loop that involves Egr-1/EGF receptor/ERK in prostate cancer cells. *Oncogene.* 29(18): 2628–2637.

Sawhney, R.S., Liu, W., Brattain, M. G. (2009). A novel role of ERK5 in integrin-mediated cell adhesion and motility in cancer cells via Fak signaling, *Journal of Cellular Physiology*, vol. 219, no. 1, pp. 152–161.

Scholzen, T., Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 182(3):311-22.

Schoppmann, S.F., Beer, A., Nirtl, N., Ba-Ssalamah, A., Brodowicz, T., Streubel, B., Birner, P. (2013). Downregulation of phosphatidylethanolamine binding protein 1 associates with clinical risk factors in gastrointestinal stromal tumors, but not with activation of the RAF-1-MEK-ETV1 pathway. *Cancer Lett.* 335(1):26-30.

Schrecengost, R., Knudsen, K.E. (2013). Molecular pathogenesis and progression of prostate cancer. *Semin Oncol.* 40(3):244-58.

Schweikert, H.U., Totzauer, P., Rohr, H.P., Bartsch, G. (1985). Correlated biochemical and stereological studies on testosterone metabolism in the stromal and epithelial compartment of human benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 134(2):403-7.

Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., Joseph R. Nevins, J.R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev.* 14(19): 2501–2514.

Sensibar, J.A. (1995). Analysis of cell death and cell proliferation in embryonic stages, normal adult, and aging prostates in human and animals. *Microsc Res Tech.* 30(4):342-50.

Sfanos, K.S., De Marzo, A.M. (2014). Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology.* 60(1): 199–215.

Shaikhibrahim, Z., Lindstrot, A., Langer, B., Buettner, R., Wernert, N. (2011). Differential expression of ETS family members in prostate cancer tissues and androgen-sensitive and insensitive prostate cancer cell lines. *Int J Mol Med.* 28(1):89-93.

Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspasas. *Cell Death Differ.* 22(4): 526–539.

Shanmugam, R., Jayaprakasan, V., Gokmen-Polar, Y., Kelich, S., Miller, K.D., Yip-Sceider, M., Cheng, L., Bhat-Nakshatri, P., Sledge, G.W. Jr., Nakshatri, H., Zheng, Q.H., Miller, M.A., DeGrado, T., Hutchins, G.D., Sweeney, C.J. (2006). Restoring chemotherapy and hormone therapy sensitivity by parthenolide in a xenograft hormone refractory prostate cancer model. *Prostate.* 66,14, pp 1498-1511.

Shariat, S.F., Chromecki, T.F., Hoefler, J., Barbieri, C.E., Scherr, D.S., Karakiewicz, P.I., Roehrborn, C.G., Montorsi, F., Culig, Z., Cavarretta, I.T. (2011). Soluble gp130 regulates prostate cancer invasion and progression in an interleukin-6 dependent and independent manner. *J Urol.* 186(5):2107-14.

Shariat, S.F., Karam, J.A., Walz, J., Roehrborn, C.G., Montorsi, F., Margulis, V., Saad, F., Slawin, K.M., Karakiewicz, P.I. (2008). Improved prediction of disease relapse after radical prostatectomy through a panel of preoperative blood-based biomarkers. *Clin Cancer Res.* 14(12):3785-91.

Shariat, S.F., Menesses-Diaz, A., Kim, I.Y., Muramoto, M., Wheeler, T.M., Alawin, K.M. (2004). Tissue expression of transforming growth factor-B1 and its receptors: correlation with pathologic features and biochemical progression in patients undergoing radical prostatectomy. *Urol.* 63: 1191-1197.

Sharifi, N., Gulley, J.L., Dahut, W.L. (2010). An update on androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 17:305-315.

Shen, M.M., Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev.* 24, 1967-2000.

Sherr, C.J., Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13(12):1501-12.

Sherwood, E.R., Van Dongen J.L., Wood, G.G., Liao, S., Kozlowski, J.M., Lee, C. (1998). Epidermal growth factor receptor activation in androgen-independent but not androgen-stimulated growth of human prostatic carcinoma cells. *Br J Cancer.* 77:855-861.

Shtivelman, E., Beer, T. M., Evans, C.P. (2014). Molecular pathways and targets in prostate cancer. *Oncotarget.* 5(17): 7217–7259.

- Shu, G.S., Lv, F., Yang, Z.L., Miao, X.Y. (2013). Immunohistochemical study of PUMA, c-Myb and p53 expression in the benign and malignant lesions of gallbladder and their clinicopathological significances. *Int J Clin Oncol.* 18(4):641-50.
- Shuch, B., Mikhail, M., Satagopan, J., Lee, P., Yee, H., Chang, C., Cordon-Cardo, C., Taneja, S.S., Osman, I. (2004). Racial disparity of epidermal growth factor receptor expression in prostate cancer. *J Clin Oncol.* 22(23):4725-9.
- Shukla, S., MacLennan, G.T., Fu, P., Patel, J., Marengo, S.R., Resnick, M.I., Gupta, S. (2004). Nuclear factor-kappaB/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression. *Neoplasia.* 6:390–400.
- Siegel, P.M., Massagué, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nature Reviews Cancer* 3, 807-820.
- Sims, J.E., Smith, D.E. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol.* 10(2):89-102.
- Singh, P., Saxena, R., Srinivas, G., Pande, G., Chattopadhyay, A. (2013). Cholesterol Biosynthesis and Homeostasis in Regulation of the Cell. *Cycle PLoS One.* 8(3): e58833.
- Slingerland, J., Pagano, M. (2000). Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol.* 183(1):10-7.
- Smith, J.C., Bennett, S., Evans, L.M., Kynaston, H.G., Parmar, M., Mason, M.D., Cockcroft, J.R., Scanlon, M.F., Davies, J.S. (2001). The effects of induced hypogonadism on arterial stiffness, body composition, and metabolic parameters in males with prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(9):4261-7.
- Sotelo, J., Esposito, D., Duhagon, M.A., Banfield, K., Mehalko, J., Liao, H., Stephens, R.M., Harris, T.J., Munroe, D.J., Wu, X. (2010). Long-range enhancers on 8q24 regulate c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(7):3001-5.
- Srigley, J.R. (2006). Key issues in handling and reporting radical prostatectomy specimens. *Arch Pathol Lab Med.* 130(3): 303-317.
- Stamey, T.A., Caldwell, M., McNeal, J.E., Nolley, R., Hemenez, M., Downs, J. (2004). The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years? *J Urol.* 172(4 Pt 1): 1297-1301.
- Starostina, N. G., Kipreos, E.T. (2013). Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors. *Trends Cell Biol.* 22(1): 33–41.

- Stein, B., Brady, H., Yang, M.X., Young, D.B., Barbosa, M.S. (1996). Cloning and characterization of MEK6, a novel member of the mitogen-activated protein kinase kinase cascade. *J Biol Chem.* 271:11427–11433.
- Steiner, M.S., Barrack, E.R. (1992). Transforming growth factor-beta 1 overproduction in prostate cancer: effects on growth in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol.* 6(1):15-25.
- Steinestel, J., Schrader, A.J., Luedeke, M. (2014). Resistance to androgen-pathway drugs in prostate cancer. *N Engl Med.* 371(23):2234.
- Stelloo, S., Sanders, J., Nevedomskaya, E., de Jong, J., Peters, D., van Leenders, G.J., Jenster, G., Bergman, A.M., Zwart, W. (2016). mTOR pathway activation is a favorable prognostic factor in human prostate adenocarcinoma. *Oncotarget.* 7(22):32916-24.
- Stine, Z.E., Walton, Z.E., Altman, B.J., Hsieh, A.L., Chi V. Dang, C.V. (2015). MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discov.* 5(10): 1024–1039.
- Stover, D.G., Bierie, B., Moses, H.L. (2007). A delicate balance: TGF-beta and the tumor microenvironment. *J Cell Biochem.* 101(4):851-61.
- Strasser, A., Cory, S., Adams, J.M. (2011). Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J.* 30(18):3667-83.
- Suh, J., Rabson, A.B. (2004). NF-kB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem.* 91, pp: 100-117.
- Sur, I., Ulvmar, M., Toftgård, R. (2008). The two-faced NF-kappaB in the skin. *Int Rev Immunol.* 27:205–223.
- Sutherland, S.I., Pe Benito, R., Henshall, S.M., Horvath, L.G., Kench, J.G. (2014). Expression of phosphorylated-mTOR during the development of prostate cancer. *Prostate.* 74(12):1231-9.
- Suzuki, A., Kawano, H., Hayashida, M., Hayasaki, Y., Tsutomi, Y., Akahane, K. (2000). Procaspase 3/p21 complex formation to resist fas-mediated cell death is initiated as a result of the phosphorylation of p21 by protein kinase A. *Cell Death Differ.* 7(8):721-8.
- Swanson, G.P., Goldman, B., Tangen, C.M., Chin, J., Messing, E., Canby-Hagino, E., Forman, J.D., Thompson, I.M., Crawford, E.D. (2008). The prognostic impact of seminal vesicle involvement found at prostatectomy and the effects of adjuvant radiation: data from Southwest Oncology Group 8794. *J Urol.* 180(6): 2453-2457.
- Syed, S. (2003). Combination chemotherapy for hormone-refractory prostate carcinoma: progress and pitfalls. *Cancer.* 98(10):2088-90.

Takeda, K., Kinoshita, I., Shimizu, Y., Ohba, Y., Itoh, T., Matsuno, Y., Shichinohe, T., Dosaka-Akita, H. (2008). Clinicopathological significance of expression of p-c-Jun, TCF4 and beta-Catenin in colorectal tumors. *BMC Cancer*. 8:328.

Takekawa, M., Tatebayashi, K., Saito, H. (2005). Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Mol Cell*. 18(3):295-306.

Tang, C., Lu, Y.H., Xie, J.H., Wang, F., Zou, J.N., Yang, J.S., Xing, Y.Y., Xi, T. (2009). Downregulation of survivin and activation of caspase-3 through the PI3K/Akt pathway in ursolic acid-induced HepG2 cell apoptosis. *Anticancer Drugs*. 20(4):249-58.

Tas, F., Yasasever, C.T., Karabulut, S., Tastekin, D., Duranyildiz, D. (2015). Serum transforming growth factor-beta1 levels may have predictive and prognostic roles in patients with gastric cancer. *Tumour Biol*. 36(3):2097-103.

Tasioudi, K.E., Saetta, A.A., Sakellariou, S., Levidou, G., Michalopoulos, N.V., Theodorou, D., Patsouris, E., Korkolopoulou, P. (2012). pERK activation in esophageal carcinomas: clinicopathological associations. *Pathol Res Pract*. 208(7):398-404.

Teicher, B.A. (2007). Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res*. 13(21):6247-51.

Teo, K., Gemmell, L., Mukherjee, R., Traynor, P., Edwards, J. (2007). Bad expression influences time to androgen escape in prostate cancer. *BJU Int*. 100(3):691-6.

Thakur, N., Sorrentino, A., Heldin, H.C., Landström, M. (2009). TGF- β uses the E3-ligase TRAF6 to turn on the kinase TAK1 to kill prostate cancer cells. *Future Oncology*. 5, 1, pp: 1-3.

Theiss, M., Wirth, M.P., Manseck, A., Frohmüller, H.G. (1995). Prognostic significance of capsular invasion and capsular penetration in patients with clinically localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *Prostate*. 27(1): 13-17.

Thomas, G.V., Schrage, M.I., Rosenfelt, L., Kim, J.H., Salur, G., deKernion, J.B., Dorey, F., Said, J., Reiter, R.E. (2000). Preoperative prostate needle biopsy p27 correlates with subsequent radical prostatectomy p27, Gleason grade and pathological stage. *J Urol*. 164(6):1987-91.

Thomas, L.R., Tansey, W.P. (2011). Proteolytic control of the oncoprotein transcription factor Myc. *Adv Cancer Res*. 110():77-106.

Thomas, S., Quinn, B.A., Das, S.K., Dash, R., Emdad, L., Dasgupta, S., Wang, X.Y., Dent, P., Reed, J.C., Pellecchia, M., Sarkar, D., Fisher, P.B. (2013). Targeting the Bcl-2 Family for Cancer Therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 17(1): 61–75.

Thompson, S.J., Mellon, K., Charlton, R.G., Marsh, C., Robinson, M., Neal, D.E. (1992). P53 and Ki-67 immunoreactivity in human prostate cancer and benign hyperplasia. *Br J Urol*. 69:609–13.

Tian, M., Neil, J.R., Schiemann, W.P. (2011). Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer. *Cell Signal*. 23(6):951-62.

Timms, B. G., Hofkamp, L. E. (2011). Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation*. 82(4-5): 173-183.

Tollefson, M.K., Karnes, R.J., Kwon, E.D., Lohse, C.M., Rangel, L.J., Mynderse, L.A., Chevillat, J.C., Sebo, T.J. (2014). Prostate cancer Ki-67 (MIB-1) expression, perineural invasion, and gleason score as biopsy-based predictors of prostate cancer mortality: the Mayo model. *Mayo Clin Proc*. 89(3):308-18.

Torii, S., Yamamoto, T., Tsuchiya, Y., Nishida, E. (2006). ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci*. 97(8):697-702.

Torrealba N, Fraile B, Olmedilla G, Martínez-Onsurbe P, Guil-Cid M, Paniagua R, and Royuela M. (2015). Expression of ERK1 and ERK2 in prostate cancer. *MAP Kinase volume 4*:5265.

Torrealba, N., Rodríguez-Berriguete, G., Fraile, B., Olmedilla, G., Martínez-Onsurbe, P., Guil-Cid, M., Paniagua, R., Royuela, M. (2016). Expression of several cytokines in prostate cancer: Correlation with clinical variables of patients. Relationship with biochemical progression of the malignance. *Cytokine*. pii: S1043-4666(16)30455-0.

Tran, P.T., Hales, R.K., Zeng, J., Aziz, K., Salih, T., Gajula, R.P., Chettiar, S., Gandhi, N., Wild, A.T., Kumar, R., Herman, J.M., Song, D.Y., DeWeese, T.L. (2012). Tissue biomarkers for prostate cancer radiation therapy. *Curr Mol Med*. 12(6):772-87.

Turjanski, A.G., Vaqué, J.P., Gutkind, J.S. (2007). MAP kinases and the control of nuclear events *Oncogene*. 26, 22, pp: 3240–3253.

Um, H.D. (2015). Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. *Oncotarget*. 7, 5 pp: 5193-5293.

- Urashima, M., Ogata, A., Chauhan, D., Hatziyanni, M., Vidriales, M.B., Dedera, D.A., Schlossman, R.L., Anderson, K.C. (1996). Transforming growth factor-beta1: differential effects on multiple myeloma versus normal B cells. *Blood*. 87(5):1928-38.
- Uzgare, A.R., Kaplan, P.J., Greenberg, N.M. (2003). Differential expression and/or activation of P38MAPK, erk1/2, and jnk during the initiation and progression of prostate cancer. *Prostate*. 55(2):128-39.
- Uzzo, R.G., Crispen, P.L., Golovine, K., Makhov, P., Horwitz, E.M., Kolenko, V.M. (2006). Diverse effects of zinc on NF-kappaB and AP-1 transcription factors: implications for prostate cancer progression. *Carcinogenesis*. 27(10):1980-90.
- Vallejos, J., Villaronga, A., Álvarez, C. Mariluis, C., Paganinia, L. González, L., De Luca, C., Dieguez, S. (2013). Actualización de la estadificación del cáncer de próstata *Rev Argent Radiol*. 77(4):301-305.
- van Dam, H., Castellazzi, M. (2001). Distinct roles of Jun:Fos and Jun:ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene*. 20:2453–2464.
- Verhagen, A.P., Aalders, T.W., Ramaekers, F.C., Debruyne, F.M. y Schalken, J.A. (1988). Differential expression of keratins in the basal and luminal compartments of rat prostatic epithelium during degeneration and regeneration. *Prostate*. 13, 25-38.
- Verma, R., Gupta, V., Singh, J., Verma, M., Gupta, G., Gupta, S., Sen, R., Ralli, M. (2015). Significance of p53 and ki-67 expression in prostate cancer. *Urol Ann*. 7(4):488-93.
- Vis, A.N., van Rhijn, B.W., Noordzij, M.A., Schröder, F.H., van der Kwast, T.H. (2002). Value of tissue markers p27(kip1), MIB-1, and CD44s for the pre-operative prediction of tumour features in screen-detected prostate cancer. *J Pathol*. 197(2):148-54.
- Vital, P., Castro, P., Tsang, S., Ittmann, M. (2014). The senescence-associated secretory phenotype promotes benign prostatic hyperplasia. *Am J Pathol*. 184(3):721-31.
- Vivanco, I., Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*; 2(7):489-501.
- Vlachostergios, P.J., Karasavvidou, F., Patrikidou, A., Voutsadakis, I.A., Kakkas, G., Moutzouris, G., Zintzaras, E., Daliani, D.D., Melekos, M.D., Papandreou, C.N. (2012). p53 and cyclooxygenase-2 expression are directly associated with cyclin D1 expression in radical prostatectomy specimens of patients with hormone-naïve prostate cancer. *Pathol Oncol Res*. 18(2):245-52.

Vlahopoulos, S.A., Logotheti, S., Mikas, D., Giarika, A., Gorgoulis, V., Zoumpourlis, V. (2008). The role of ATF-2 in oncogenesis. *Bioessays*. 30(4):314-27.

Voisin, L., Julien, C., Duhamel, S., Gopalbhai, K., Claveau, I., Saba-El-Leil, M.K., Rodrigue-Gervais, I.G., Gaboury, L., Lamarre, D., Basik, M., Meloche, S. (2008). Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors. *BMC Cancer*. 8():337.

Voronov, E., Carmi, Y., Apte, R.N. (2014). The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. *Front Physiol*. 5:114.

Voronov, E., Dotan, S., Yakov Krelin, Y., Song, X., Elkabets, M., Carmi, Y., Rider, P., Cohen, I., Romzova, M., Kaplanov, I, Apte, R.N. (2013). Unique Versus Redundant Functions of IL-1 α and IL-1 β in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 4: 177.

Wang, A.S., Chen, C.H., Chou, Y.T., Pu, Y.S. (2016). Perioperative changes in TGF- β 1 levels predict the oncological outcome of cryoablation-receiving patients with localized prostate cancer. *Cryobiology*. 73(1):63-8.

Wang, L., Liu, R., Li, W., Chen, C., Katoh, H., Chen, G.Y., McNally, B., Lin, L., Zhou, P., Zuo, T., Cooney, K.A., Liu, Y., Zheng, P. (2009). Somatic single hits inactivate the X-linked tumor suppressor FOXP3 in the prostate. *Cancer Cell*. 16(4):336-46.

Wang, Q., Wu, X., Wu, T., Li, G.M., Shi, Y. (2014). Clinical significance of RKIP mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*. 35(5):4377-80.

Wang, X., Kruithof-de, J.M., Economides, K.D., Walker, D., Yu, H., Halili, M.V., Hu, Y., Price, S.M., Abate-Shen, C., Shen, M.M. (2009). A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature*. 461(7263):495-500.

Wang, Y., Fisher, J.C., Mathew, R., Ou, L., Otieno, S., Sublet, J., Xiao, L., Chen, J., Roussel, M.F., Kriwacki, R.W. (2011). Intrinsic disorder mediates the diverse regulatory functions of the Cdk inhibitor p21. *Nat Chem Biol*. 7(4):214-21.

Wali, J.A., Masters, S.L., Thomas, H.E. (2013). Linking metabolic abnormalities to apoptotic pathways in Beta cells in type 2 diabetes. *Cells*. 2(2):266-83.

Wein, A., Kavoussi, L., Novick, A., Partin, A., Peters, G. (2015). *Campbell-Walsh Urología*. 10^a ed. Panamericana. España.

Welsch, U. (2014). *Histología*. 3^a ed. Panamericana. España.

Whyte, J., Bergin, O., Bianchi, A., McNally, S., Martin, F. (2009). Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in

experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast Cancer Res.* 11(5):209.

Wikström, P., Damber, J., Bergh, A. (2001). Role of transforming growth factor-beta1 in prostate cancer. *Microsc Res Tech.* 52(4):411-9.

Wilsbacher, J.L., Goldsmith, E.J., Cobb, M. (1999). Phosphorylation of MAP kinases by MAP/ERK induces multiple regions of MAPkinases. *J Biol Chem.* 11: 16988-16994.

Wolf, A.M., Wender, R.C., Etzioni, R.B., Thompson, I.M., D'Amico, A.V., Volk, R.J., Brooks, D.D., Dash, C., Guessous, I. yrews, K., DeSantis, C. y Smith, R.A. (2010). American Cancer Society.

Wolters, T., Vissers, K.J., Bangma, C.H., Schröder, F.H., van Leenders, G.J. (2010). The value of EZH2, p27(kip1), BMI-1 and MIB-1 on biopsy specimens with low-risk prostate cancer in selecting men with significant prostate cancer at prostatectomy. *BJU Int.* 106(2):280-6.

Wu, C.C., Bratton, S.B. (2012). Regulation of the Intrinsic Apoptosis Pathway by Reactive Oxygen Species. *Antioxid Redox Signal.* 19(6): 546–558.

Wu, C.T., Chang, Y.H., Lin, W.Y., Chen, W.C., Chen, M.F. (2015). TGF Beta1 Expression Correlates with Survival and Tumor Aggressiveness of Prostate Cancer. *Ann Surg Oncol.* 22 Suppl 3:S1587-93.

Wu, P.K., Park, J.I. (2015). MEK1/2 Inhibitors: Molecular Activity and Resistance Mechanisms. *Semin Oncol.* 42(6):849-62.

Wu, T.T., Wang, J.S., Jiaan, B.P., Yu, C.C., Tsai, J.Y., Lin, J.T., Huang, J.K. (2007). Role of p21(WAF1) and p27(KIP1) in predicting biochemical recurrence for organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Chin Med Assoc.* 70(1):11.

Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124 471–484.

Xiao, D., Qu, X., Weber, H.C. (2002). GRP receptor-mediated immediate early gene expression and transcription factor Elk-1 activation in prostate cancer cells. *Regul Pept.* 109(1-3):141-8.

Yamamoto, Y., Gaynor, R.B. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NF-κB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest.* 107(2): 135–142.

Yan, J., Ojo, D., Kapoor, A., Lin, X., Pinthus, J.H., Aziz, T., Bismar, T.A., Wei, F., Wong, N., De Melo, J., Cutz, J.C., Major, P., Wood, G., Peng, H., Tang, D. (2016). Neural cell adhesion protein CNTN1 promotes the metastatic progression of prostate cancer. *Cancer Res.* pii: canres.1898.2015.

Yancey, D., Nelson, Daniele Baiz, D., Hassan, S., Flores, A., Pullikuth, A., Karpova, Y., Axanova, L., Moore, V., Sui, G., Kulik, G. (2013). BAD Dephosphorylation and Decreased Expression of MCL-1 Induce Rapid Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *PLoS One*. 8(9): e74561.

Yang, S.H., Hsu, C.H., Lee, J.C., Tien, Y.W., Kuo, S.H., Cheng, A.L. (2013). Nuclear expression of glioma-associated oncogene homolog 1 and nuclear factor- κ B is associated with a poor prognosis of pancreatic cancer. *Oncology*. 85:86–94.

Ye, L., Kynaston, H.G., Jiang, W.G. (2007). Bone metastasis in prostate cancer: molecular and cellular mechanisms (Review). *Int J Mol Med*. 20(1):103-11.

Ye, N., Ding, Y., Wild, C., Shen, Q., Zhou, J. (2014). Small molecule inhibitors targeting activator protein 1 (AP-1). *J Med Chem*. 57(16):6930-48.

Yoo, T. K., Cho, H. J. (2012). Benign prostatic hyperplasia: from bench to clinic. *Korean J Urol* 53(3): 139-148.

Yoshimine, S., Kikuchi, E., Kosaka, T., Mikami, S., Miyajima, A., Okada, Y., Oya, M. (2013). Prognostic significance of Bcl-xL expression and efficacy of Bcl-xL targeting therapy in urothelial carcinoma. *Br J Cancer*. 108(11):2312-20.

Youle, R.J., Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(1):47-59.

Yuan, J.P., Wang, L.W., Qu, A.P., Chen, J.M., Xiang, Q.M., Chen, C., Sun, S.R., Pang, D.W., Liu, J., Li, Y. (2015). Quantum dots-based quantitative and in situ multiple imaging on ki67 and cytokeratin to improve ki67 assessment in breast cancer. *PLoS One*. 10(4):e0122734.

Yun, W.J, Bang, S.H., Min, K.H., Kim, S.W., Lee, M.W., Chang, S.E. (2013). Epidermal growth factor and epidermal growth factor signaling attenuate laser-induced melanogenesis. *Dermatol Surg*. 39(12):1903-11.

Zafarana, G., Ishkanian, A.S., Malloff, C.A., Locke, J.A., Sykes, J., Thoms, J., Lam, W.L., Squire, J.A., Yoshimoto, M., Ramnarine, V.R., Meng, A., Ahmed, O., Jurisica, I., Milosevic, M., Pintilie, M., van der Kwast, T., Bristow, R.G. (2012). Copy number alterations of c-MYC and PTEN are prognostic factors for relapse after prostate cancer radiotherapy. *Cancer*. 118(16):4053-62.

Zarubin, T., Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*. 15(1):11-8.

Zebisch, A., Czernilofsky, A.P., Keri, G., Smigelskaite, J., Sill, H., Troppmair, J. (2007). Signaling through RAS-RAF-MEK-ERK: from basics to bedside. *Current Medicinal Chemistry*. 14, 5, pp: 601–623.

Zeng, L., Rowland, R.G., Lele, S.M., Kyprianou, N. (2004). Apoptosis incidence and protein expression of p53, TGF-beta receptor II, p27Kip1, and Smad4 in benign, premalignant, and malignant human prostate. *Hum Pathol*. 35(3):290-7.

Zellweger, T., Ninck, C., Bloch, M., Mirlacher, M., Koivisto, P.A., Helin, H.J., Mihatsch, M.J., Gasser, T.C., Bubendorf, L. (2005). Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. *Int J Cancer*. 113:619–628.

Zhang, K., Jiao, K., Xing, Z., Zhang, L., Yang, J., Xie, X., Yang, L. (2014). Bcl-xL overexpression and its association with the progress of tongue carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 7(11):7360-77.

Zhang, L., Hou, Y., Ashktorab, H., Gao, L., Xu, Y., Wu, K., Zhai, J., Zhang, L. (2010). The impact of C-MYC gene expression on gastric cancer cell. *Mol Cell Biochem*. 344(0): 125–135.

Zhang, L., Yu, J. (2013). Role of apoptosis in colon cancer biology, therapy, and prevention. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 9(4).

Zhang, W., Meng, Y., Liu, N., Wen, X.F., Yang, T. (2015). Insights into Chemoresistance of Prostate Cancer. *Int J Biol Sci*. 11(10):1160-70.

Zhao, H., Faltermeier, C.M., Mendelsohn, L., Porter, P.L., Clurman, B.E., Roberts, J.M. (2014). Mislocalization of p27 to the cytoplasm of breast cancer cells confers resistance to anti-HER2 targeted therapy. *Oncotarget*. 5(24):12704-14.

Zhao, M., New, L., Kravchenko, V.V., Kato, Y., Gram, H., di Padova, F., Olson, E.N., Ulevitch, R.J., Han, J. (1999). Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol Cell Biol*. 19(1):21-30.

Zhou, M., Li, Y., Hu, Q., Bai, X.C., Huang, W., Yan, C., Scheres, S.H., Shi, Y. (2015). Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome c- and dATP-mediated activation of Apaf-1. *Genes Dev*. 29(22):2349-61.

Zhou, W., An, G., Wei, P., Chen, W. (2014). Significance of p85 expression as a prognostic factor for patients with breast cancer. *Oncol Lett*. 8(4):1657-1661.

Zhou, X., Li, J., Marx, C., Tolstov, Y., Rauch, G., Herpel, E., Macher-Goeppinger, S., Roth, W., Grüllich, C., Pahernik, S., Hohenfellner, M., Duensing, S. (2015). Uncoupling of

PUMA Expression and Apoptosis Contributes to Functional Heterogeneity in Renal Cell Carcinoma - Prognostic and Translational Implications. *Transl Oncol.* 8(6):480-6.

Zhou, Y., Yau, C., Gray, J.W., Chew, K., Dairkee, S.H., Moore, D.H., Eppenberger, U., Eppenberger-Castori, S., Benz, C.C. (2007). Enhanced NF kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer. *BMC Cancer.* 7():59.

Zhou, Z., Flesken-Nikitin, A., Corney, D.C., Wang, W., Goodrich, D.W., Roy-Burman, P., Nikitin, A.Y. (2006). Synergy of p53 and Rb deficiency in a conditional mouse model for metastatic prostate cancer. *Cancer Res.* 66(16):7889-98.

Zietman, A., Smith, J., Klein, E., Droller, M., Dasgupta, P., Catto, J. (2016). Describing the Grade of Prostate Cancer: Consistent Use of Contemporary Terminology Is Now Required. *Eur Urol.* 70(1):1.

Zudaire Bergera, J.J., Sánchez Zalabardo, D., Arocena, J., Sanz Pérez, G., Díez Caballero, F., López Ferrandis, J., Rosell Costa, D., Robles García, J.E., de Alava, E., Berrián Polo, J.M. (2000). p53 and Ki67 expression in specimens of radical prostatectomy. Relationship with clinico-pathologic data and survival. *Actas Urol Esp.* 24(4):307-13.

Zoumpourlis, V., Papassava, P., Linardopoulos, S., Gillespie, D., Balmain, A., Pintzas, A. (2000). High levels of phosphorylated c-Jun, Fra-1, Fra-2 and ATF-2 proteins correlate with malignant phenotypes in the multistage mouse skin carcinogenesis model. *Oncogene.* 19(35):4011-21.

ANEXO I: Publicaciones

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Prognostic value of inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) and caspases in prostate cancer: caspase-3 forms and XIAP predict biochemical progression after radical prostatectomy

Gonzalo Rodríguez-Berriguete¹, Norelia Torrealba¹, Miguel Angel Ortega¹, Pilar Martínez-Onsurbe², Gabriel Olmedilla², Ricardo Paniagua¹, Manuel Guil-Cid³, Benito Fraile¹ and Mar Royuela^{1*}

Abstract

Background: The expression status of apoptotic regulators, such as caspases and inhibitors of apoptosis proteins (IAPs), could reflect the aggressiveness of tumors and, therefore, could be useful as prognostic markers. We explored the associations between tumor expression of caspases and IAPs and clinicopathological features of prostate cancer – clinical and pathological T stage, Gleason score, preoperative serum PSA levels, perineural invasion, lymph node involvement, surgical margin status and overall survival – and evaluated its capability to predict biochemical progression after radical prostatectomy.

Methods: Protein expression of caspases (procaspase-8, cleaved caspase-8, procaspase-3, cleaved caspase-3, caspase-7 and procaspase-9) and IAPs (cIAP1/2, cIAP2, NAIP, Survivin and XIAP) was analyzed by immunohistochemistry in radical prostatectomy samples from 84 prostate cancer patients. Spearman's test, Kaplan-Meier curves, and univariate and multivariate Cox proportional hazard regression analysis were performed.

Results: cIAP1/2, cIAP2, Survivin, procaspase-8, cleaved caspase-8, procaspase-3 and caspase-7 expression correlated with at least one clinicopathological feature of the disease. Patients negative for XIAP, procaspase-3 or cleaved caspase-3 had a significantly worse prognosis. Of note, XIAP, procaspase-3 and cleaved caspase-3 were predictors of biochemical progression independent of Gleason score and pathological T stage.

Conclusions: Our results indicate that alterations in the expression of IAPs and caspases contribute to the malignant behavior of prostate tumors and suggest that tumor expression of XIAP, procaspase-3 and cleaved caspase-3 may help to identify prostate cancer patients at risk of progression.

Keywords: Apoptosis, Caspases, Biochemical progression, Inhibitors of apoptosis proteins, Prostate cancer

* Correspondence: mar.royuela@uah.es

¹Department of Biomedicine and Biotechnology, University of Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Background

There are several well-established markers that predict prostate cancer progression after radical prostatectomy, including Gleason grade, pathological stage and preoperative serum PSA [1]. Identification of biological factors that better reflect aggressiveness of tumors could help to improve the prediction capability of the existing makers.

Apoptosis is a type of programmed cell death that ensures the elimination of unnecessary or potentially harmful cells. Caspases constitute a family of cysteine proteases involved in the initiation and execution of the apoptotic program. The apoptotic cascades entail the activation by proteolysis of initiator caspases (caspase-2, -8, -9 and -10), which in turn proteolyze and activate executioner caspases (caspase-3, -6 and -7) [2]. There are two major apoptotic pathways: the extrinsic and the intrinsic (or mitochondrial) apoptotic pathways. These apoptotic pathways converge in the activation of executioner caspases, which proteolyze a plethora of substrates ultimately leading to the death of the cell [3].

Evasion of apoptosis, a characteristic of tumor cells, occurs by alteration in the levels and functions of apoptosis regulators [4]. In this regard, loss of expression of caspases is frequent in several human malignancies, including prostate cancer [5], and has been linked in some cases to poor prognosis [6, 7] and resistance to cell death induced by death receptors and chemotherapeutic compounds [8, 9]. Other important apoptosis regulators frequently altered in human cancers are the inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). The IAP family in humans comprises eight members: NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), ILP2 (IAP-like protein 2), cIAP1 (cellular IAP 1), cIAP2, BRUCE (Baculoviral IAP repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme), Survivin and Livin (ML-IAP), characterized by containing at least one baculoviral IAP repeat (BIR) domain [10]. IAPs are able to inhibit apoptosis induced by a variety of stimuli through different mechanisms, including direct inhibition of caspases (XIAP), sequestration of pro-apoptotic molecules such as SMAC/DIABLO (cIAP1/2, Survivin, Livin), ubiquitin-mediated degradation and non-degradative inactivation of caspases (cIAP1/2, XIAP), and activation of the pro-survival NF- κ B pathway (cIAP1/2, XIAP), among others [10]. In addition, some IAPs can regulate other processes involved in cancer, such as cell cycle, cancer-related inflammation, cell invasion and metastasis [10, 11]. The expression of IAPs has been studied in several types of cancer, such as esophageal [12], colon [13], cervical [14] or prostate [15] cancer.

The aim of the present work was to evaluate the prognostic capability of the tumor expression of a broad panel of IAPs and caspases for biochemical progression after radical prostatectomy, as well as to assess its

association with the clinicopathological features of prostate cancer.

Methods

Patients

All the procedures were examined and approved by the University of Alcalá and Príncipe de Asturias Hospital Ethics Committees (PI13/1801; 2013/003/20130214) and were in accordance with the ethical standards of the Committee for Human Experimentation, with the Helsinki Declaration of 1975 (revised in Tokyo 2004) and the Committee on Publication Ethics guidelines. This study was performed with the written consent of the patients or their relatives. All pathological, clinical or personal data were anonymized and separated from any personal identifiers. The present study included 84 men who were diagnosed with prostate cancer and underwent radical prostatectomy as definitive therapy between 1992 and 1999, without receiving pre-surgical treatment, or post-surgical therapy before biochemical progression. Only 40.5 % ($n = 34$) of patients had biochemical progression (32 patient at 5 years and 2 patients between 5 and 10 years). In all patients they were studied lymph node but only six patients are positives. 41.7 % of patients had positive surgical margins. Prostate cancer was detected by serum PSA screening and rectal examination, and diagnostic was confirmed by histopathological examination of needle biopsy cores. The median age (range) at the time of surgery was 66 (52–74). Patients were generally scheduled to have a serum PSA measure every 3 months for the first year and every 6 months thereafter. Patients with PSA persistence after radical prostatectomy were included in the study. Median follow-up (range) time of the cohort was 76.2 (15.6–158.4) months, being defined as the time between the surgery and the biochemical progression or the last record. Clinicopathological features of the patients are shown in Table 1.

Reagents

Total serum PSA was measured by the AxSYM system (Abbott, IL). The following antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA): mouse antihuman caspase-8 (for detection of procaspase-8, used at a 1:25 dilution), caspase-8/p20 (cleaved caspase-8, 1:50), caspase-3 (procaspase-3, 1:25), caspase-3/p20 (cleaved caspase-3, 1:100), caspase-7/p20 (caspase-7, 1:25), caspase-9 (procaspase-9, 1:50) and Survivin (1:75); rabbit antihuman cIAP2 (1:75) and XIAP (1:100); and goat antihuman cIAP1/2 (1:150) and NAIP (1:100). Biotin-conjugated antibodies were from Dako (Barcelona, Spain). Avidin-biotin peroxidase complex (ABC kit) was from Vector Laboratories (Burlingame, CA).

Table 1 Clinicopathological features of patients

	Median (range)
Age	66 (52–74)
Preoperative serum PSA (ng/ml)	10.3 (0.2–118.0)
	% (n)
Preoperative serum PSA	
<10 ng/ml	41.7 (35)
≥10 ng/ml	58.3 (49)
Gleason score	
<7	28.6 (24)
7	47.6 (40)
>7	23.8 (20)
Clinical T stage	
I	56 (47)
II	44 (37)
Pathological T stage	
II	64.3 (54)
III	32.1 (27)
IV	3.6 (3)
Node involvement	7.1 (6)
Positive surgical margins	41.7 (35)
Perineural invasion	17.9 (15)
Total Biochemical progression	40.5 (34)
at 5 years	38.1 (32)
5 - 10 years	2.4 (2)
Survival	64.7 ^a (22)
Deaths	35.3 ^a (12)

^aExpressed respect total biochemical progression

Immunohistochemical analysis

Immunohistochemistry was performed following the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method as previously described [15]. Specificity controls for immunohistochemistry were as reported previously [5, 15]. Briefly, for negative controls tissues were incubated with blocking peptides or pre-immune serum (Santa Cruz Biotechnology). Additionally, in five of the samples, one part of the prostate tissues was frozen in liquid nitrogen immediately after surgery and maintained at -80°C , to be later used for Western blotting analysis in order to test antibody specificity. In this portion, cryostat sections were stained with toluidine blue to confirm the histopathological diagnosis.

Immunostaining in the cancerous epithelium was evaluated by two independent pathologists (P.M.-O. and G.O.), blinded for the outcome measure, in five randomly selected fields per section and six sections per patient. Patients were stratified as positive (those showing staining in more than 5 % of the cancerous

epithelium) or negative, as has been previously described [5, 15].

Statistical analysis

The main outcome measure of the study was time to biochemical progression at 10 years, defined as the time between definitive therapy to the first of at least two consecutive elevations in the total serum PSA level above 0.2 ng/ml. Established prognostic variables included in the study were preoperative serum PSA levels, pathological and clinical T stages (2010 AJCC/UICC TNM classification [16]), postoperative Gleason score, perineural invasion, lymph node involvement, surgical margin status and overall survival. The pathologists undertook a regrading of the samples following the 2005 ISUP consensus [17] and the reassigned Gleason scores were used in the analyses. To evaluate the association between clinicopathological and immunohistochemical variables Spearman's test was performed. Log-rank test and Kaplan-Meier curves were used for survival comparisons. To explore the correlation of the studied immunohistochemical parameters and the established prognostic variables with biochemical progression, univariate and multivariate Cox proportional hazard regression analyses were performed. All statistical analyses were performed using the SPSS 19.0 software (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). *P* values < 0.05 were considered as significant.

Results

Expression of IAPs and caspases and its correlation with clinicopathological features

Immunohistochemical analysis revealed a predominantly cytoplasmic expression pattern for all the studied proteins (Fig. 1). This part has been previously published [5, 15]. Table 2 shows the percentage (number) of patients with positive immunoreactions for the studied proteins. Spearman's test evidenced significant positive correlations between a) cIAP1/2 and pathological T stage; b) cIAP2 and positive surgical margins; c) Survivin and perineural invasion; d) procaspase-8 and both clinical and pathological T stages; f) cleaved caspase-8 and preoperative serum PSA; and g) caspase-7 and Gleason score and node involvement (Tables 3 and 4). Moreover, there was a significant inverse correlation between procaspase-3 and positive surgical margins (Tables 3 and 4). Interestingly, expression of XIAP, procaspase-3 and cleaved caspase-3 inversely correlated with the occurrence of biochemical progression, indicating that these proteins can have a role as prognostic markers (Tables 3 and 4). Accordingly, the expression of XIAP and cleaved caspase-3 were positively correlated with overall survival (Tables 3 and 4). On the other hand, Survivin expression was inversely correlated with overall survival.

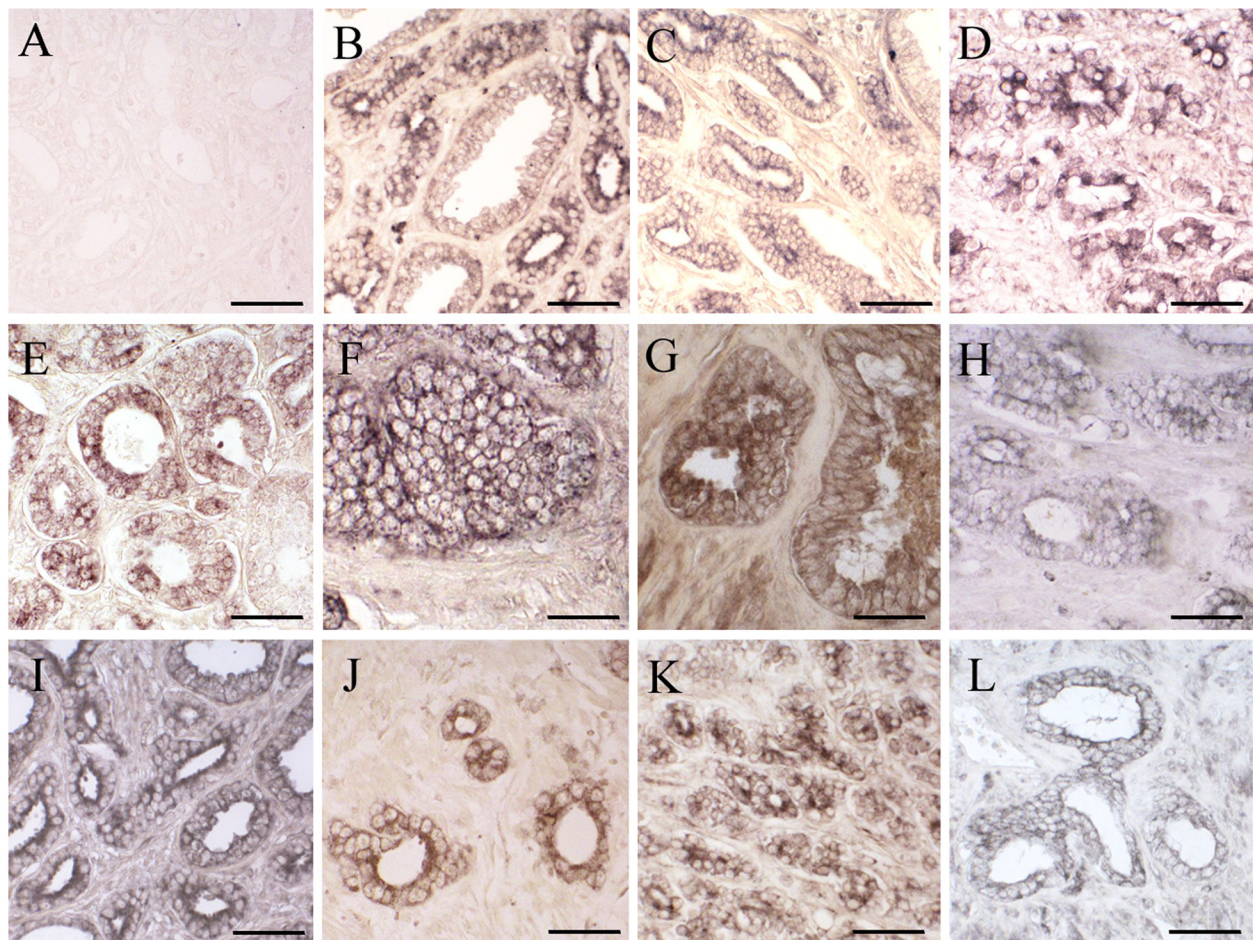


Fig. 1 Expression of IAPs and caspases in prostate cancer tissue. As an example, a negative immunoreaction for XIAP (a) is shown. Positive tumor immunostaining for cIAP1/2 (b), cIAP2 (c), NAIP (d), Survivin (e), XIAP (f), procaspase-8 (g), cleaved caspase-8 (h), procaspase-3 (i), cleaved caspase-3 (j), procaspase-9 (k) and caspase-7 (l) is shown. Scale bars: 20 μ m (d, f, g, h, j), 25 μ m (a, b, e, i, l) and 30 μ m (c, k)

Univariate analysis for time to biochemical progression of tumor expression of IAPs and caspases

Differences between the biochemical progression free-survival times of the groups of patients stratified according to tumor expression of IAPs and caspases were analyzed by the Kaplan-Meier method, using the log-rank as test for significance. Patients negative for XIAP (Fig. 2) and, more markedly, for procaspase-3 and cleaved

caspase-3 (Fig. 3) had significantly shorter times to biochemical progression than positive patients.

Univariate Cox proportional hazard regression analysis confirmed the results obtained in the Kaplan-Meier curves (Table 5). Of note, patients negative for procaspase-3, cleaved caspase-3 and, at limit of significance, for XIAP had a higher risk of progression than positive patients (Table 5).

Table 2 Percentage (number) of positive patients for IAPs (left panel) and caspases (right panel)

	% (n)		% (n)
cIAP1/2	61.90 (52)	Procaspase-8	28.57 (24)
cIAP2	33.33 (28)	Cleaved caspase-8	48.80 (41)
NAIP	58.33 (49)	Procaspase-3	35.71 (30)
Survivin	20.23 (17)	Cleaved caspase-3	57.14 (48)
XIAP	35.71 (30)	Caspase-7	39.28 (33)
		Procaspase-9	38.09 (32)

Multivariate Cox proportional hazard regression analysis for time to biochemical progression of XIAP, procaspase-3, cleaved caspase-3 and classic markers

Finally, we assessed the prognostic capability of the immunohistochemical parameters in conjunction with classic markers. In our series, Gleason score, pathological T stage and node involvement, but not preoperative PSA, perineural invasion and positive surgical margins had a prognostic value for biochemical progression in univariate analysis (Table 6). Gleason score and pathological T

Table 3 Correlation between tumor expression of IAPs and caspases and clinicopathological features

	cIAP1/2		cIAP2		NAIP		Survivin		XIAP	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Preoperative serum PSA	-0.066	0.549	-0.017	0.877	0.069	0.531	0.185	0.091	-0.025	0.228
Pathological T stage	0.219	0.045*	0.019	0.866	0.037	0.735	0.101	0.362	-0.136	0.218
Clinical T stage	0.103	0.349	0.034	0.759	0.118	0.287	0.090	0.414	0.089	0.419
Gleason score	0.153	0.165	-0.124	0.262	0.052	0.641	-0.172	0.118	0.084	0.446
Perineural invasion	0.110	0.320	0.066	0.551	0.079	0.476	0.229	0.036*	-0.088	0.426
Node involvement	0.122	0.267	0.000	1.000	0.047	0.672	-0.025	0.824	0.030	0.455
Positive surgical margins	0.066	0.549	0.222	0.042*	0.127	0.251	0.055	0.619	-0.179	0.109
Biochemical progression	-0.002	0.983	0.086	0.438	-0.041	0.711	0.188	0.086	-0.210	0.056
Survival	-0.090	0.414	-0.077	0.489	0.119	0.281	0.239	0.019*	-0.331	0.002*

Correlations between immunohistochemical variables (according to the stratification shown in Table 2) and preoperative serum PSA, pathological T stage, clinical T stage and Gleason score were evaluated by Spearman's test (*r*, correlation coefficient). **p* < 0.05. (Note: significant correlations after Bonferroni correction should be those with a *p* < 0.005)

stage are two of the most important established prognostic factors for prostate cancer [1]. For this reason, and to prevent an overfitting of the model, only these two established prognostic factors were introduced in different multivariate Cox hazard regression models, along with the immunohistochemical parameters which resulted significant/borderline significant in the univariate analyses – i.e. XIAP, procaspase-3 and cleaved caspase-3. In the multivariate analysis, XIAP (Table 7A), procaspase-3 (Table 7B) and cleaved caspase-3 (Table 7C) remained as independent prognostic factors after adjusting for the effects of Gleason score and pathological T stage.

Discussion

In spite of the mounting evidence supporting a predominant pro-tumor role of the IAPs in prostate cancer, in the present study, according to the Spearman's test, only few associations were found between the expression of these proteins and adverse clinicopathological features. Thus, significant positive correlations were found between

cIAP1/2 and pathological T stage, cIAP2 and positive surgical margins, and between Survivin and perineural invasion. Furthermore, we found positive correlations between expression of some caspases and adverse clinicopathological features: procaspase-8 correlated with both clinical and pathological T stages, cleaved caspase-8 correlated with preoperative serum PSA, and caspase-7 correlated with Gleason score and the presence of lymph node metastasis. Although at first glance the associations found for caspases may seem contradictory, some points should be considered. First, the pro-apoptotic activity of caspases mostly relies on their cleaved forms and, therefore, higher levels of procaspases do not necessarily entail enhanced apoptotic signaling. Further, there are recent evidences that caspase-8 could exert a pro-tumor role by inducing cell motility, adhesion and metastasis [18]. In this regard, Finlay et al. [19] demonstrated that caspase-8 is involved in the adhesion-mediated activation of the ERK 1/2 signaling pathway. Using caspase-8-null mouse embryo fibroblasts, Helfer et al. [20] demonstrated that caspase-8 is

Table 4 Correlation between tumor expression of IAPs and caspases and clinicopathological features

	Procaspace-8		Cleaved caspase-8		Procaspace-3		Cleaved caspase-3		Caspase-7		Procaspace-9	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Preoperative serum PSA	0.000	1.000	0.294	0.007*	0.076	0.494	-0.098	0.377	0.185	0.091	0.017	0.881
Pathological T stage	0.216	0.048*	-0.056	0.611	-0.154	0.161	0.160	0.146	-0.023	0.833	-0.072	0.513
Clinical T stage	0.235	0.031*	-0.003	0.979	-0.161	0.144	-0.055	0.617	0.121	0.237	-0.054	0.625
Gleason score	0.118	0.287	-0.006	0.954	0.013	0.904	0.107	0.331	0.289	0.008*	-0.151	0.171
Perineural invasion	0.118	0.285	0.104	0.345	-0.023	0.834	0.027	0.808	0.007	0.951	-0.046	0.680
Node involvement	-0.175	0.110	0.007	0.952	-0.110	0.318	0.147	0.183	0.250	0.022*	0.068	0.539
Positive surgical margins	0.160	0.145	-0.149	0.176	-0.277	0.011*	-0.098	0.377	-0.037	0.738	0.133	0.229
Biochemical progression	0.015	0.890	-0.126	0.254	-0.362	0.001*	-0.364	0.001*	0.082	0.461	0.002	0.983
Survival	0.163	0.139	0.014	0.898	-0.161	0.142	-0.250	0.022*	-0.202	0.065	-0.133	0.229

Correlations between immunohistochemical variables (according to the stratification shown in Table 2) and preoperative serum PSA, pathological T stage, clinical T stage and Gleason score were evaluated by Spearman's test (*r*, correlation coefficient). **p* < 0.05. (Note: significant correlations after Bonferroni correction should be those with a *p* < 0.005)

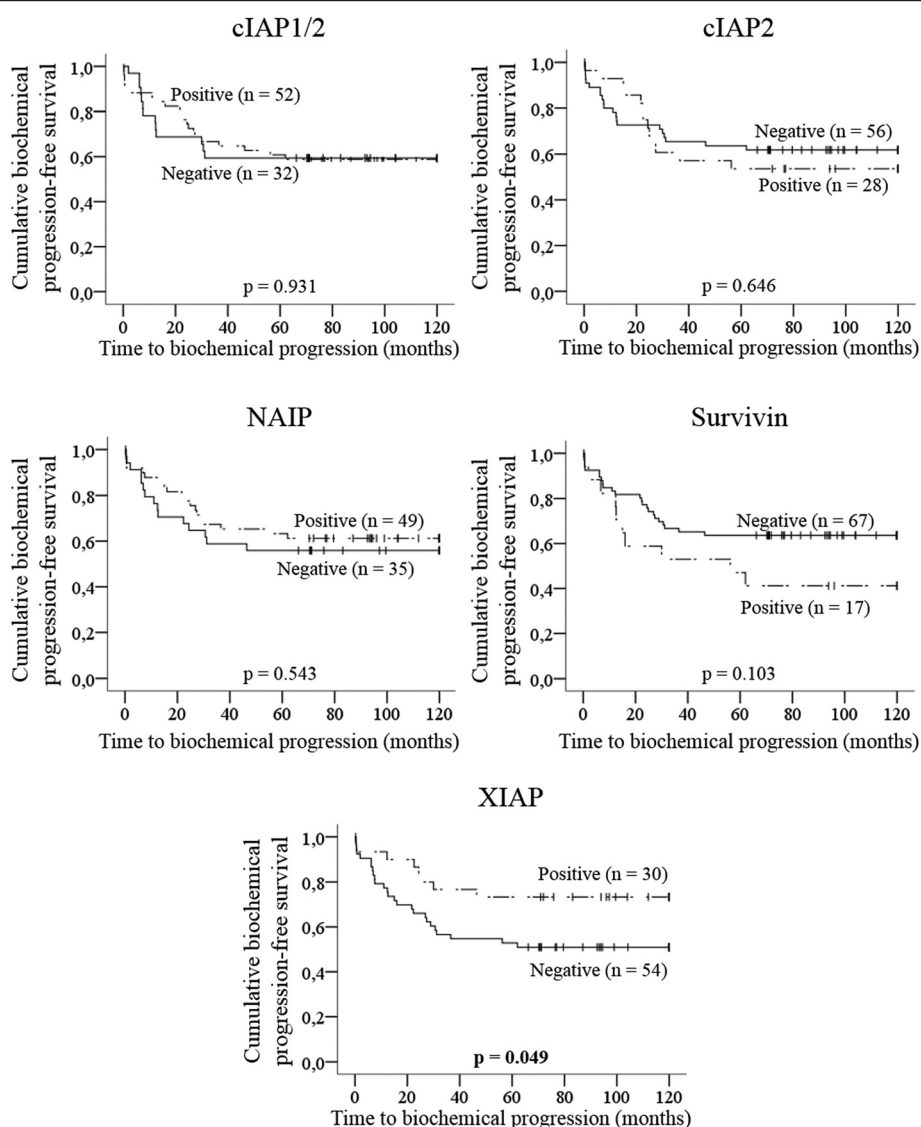


Fig. 2 Kaplan-Meier curves for time to biochemical progression according to tumor expression of IAPs. Vertical tick marks represent censored observations. Statistical significance was evaluated by log-rank test (p values). Bold value indicates statistical significance

able to promote cell motility and calpain activity under non apoptotic conditions. Interestingly, it has been shown that the role of caspase-8 on cell motility, adhesion and metastasis is independent of the caspase catalytic activity and has been linked to the phosphorylation of procaspase-8 on tyrosine 380, which prevents its cleavage [20]. In addition to these pro-tumor roles of caspase-8, cells with impaired apoptosis despite displaying continued caspase activation have been shown to secrete mitogenic signals in a manner which is dependent on the catalytic activity of caspases [21]. The persistence of these cells could result in increased proliferation of the neighbor cells and, consequently, promote tumor progression [21]. These less-known functions of caspases could also explain why higher expression levels of some of them have been

correlated with a poor prognosis in some cancers [22, 23]. All these pro-tumor activities of caspases should be taken into account in future research.

In the present work, we also found that patients with positive immunostaining for XIAP had a significantly better prognosis compared to negative patients. This result is not surprising, as higher XIAP expression has been reported as a favorable prognostic factor in other cancers [24, 25]. Interestingly, it has been shown that TRAMP (transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate) mice deficient in XIAP tend to have a more aggressive disease [26]. In addition, our results are in agreement with a study by Seligson et al. [27] in which higher XIAP expression was also a favorable prognostic factor for biochemical progression after radical prostatectomy. Of note, in that study,

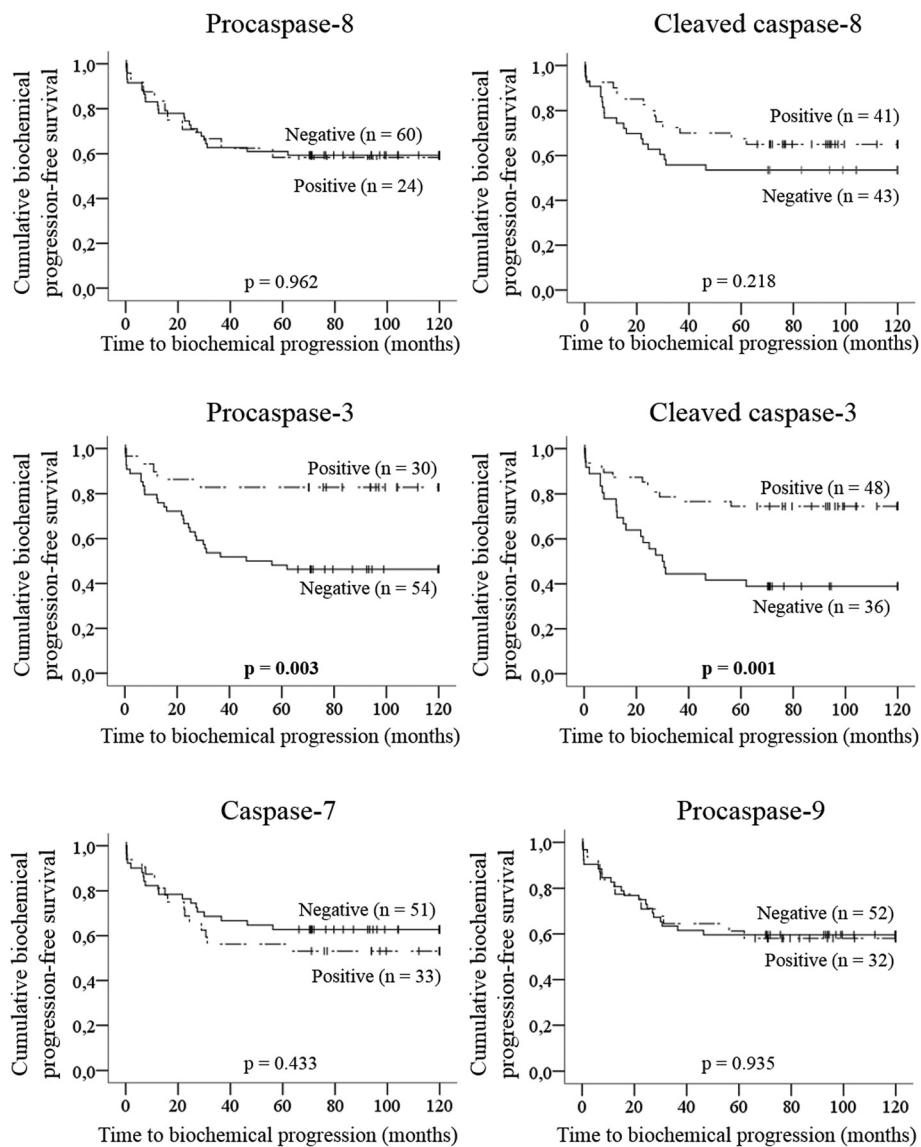


Fig. 3 Kaplan-Meier curves for time to biochemical progression according to tumor expression of caspases. Vertical tick marks represent censored observations. Statistical significance was evaluated by log-rank test (*p* values). Bold values indicate statistical significance

Table 5 Univariate Cox proportional hazard regression analysis for time to biochemical progression according to tumor expression of IAPs and caspases

	<i>p</i>	HR (95 % CI)		<i>p</i>	HR (95 % CI)
clAP1/2	0.931	0.970 (0.485-1.938)	Procaspase-8	0.962	1.018 (0.487-2.129)
clAP2	0.646	1.176 (0.588-2.351)	Cleaved caspase-8	0.222	0.653 (0.330-1.294)
NAIP	0.543	0.811 (0.412-1.596)	Procaspase-3	0.005*	0.260 (0.100-0.672)
Survivin	0.108	1.831 (0.875-3.834)	Cleaved caspase-3	0.002*	0.327 (0.161-0.662)
XIAP	0.055	0.460 (0.208-1.016)	Caspase-7	0.435	1.310 (0.665-2.579)
			Procaspase-9	0.936	1.029 (0.515-2.055)

Abbreviations: CI confidence interval, HR hazard ratio. Bold values indicate statistical significance. **p* < 0.05

Table 6 Univariate Cox proportional hazard regression analysis for time to biochemical progression according to clinicopathological features

	<i>p</i>	HR (95 % CI)
Preoperative serum PSA	0.199	1.602 (0.780-3.287)
Pathological T stage	0.006*	2.155 (1.253-3.706)
Gleason score	0.016*	1.816 (1.118-2.949)
Perineural Invasion	0.259	1.579 (0.715-3.489)
Node involvement	0.000*	5.053 (2.039-12.518)
Positive surgical margins	0.374	1.357 (0.692-2.661)

Abbreviations: CI confidence interval, HR hazard ratio. Bold values indicate statistical significance. **p* < 0.05

despite taking different methodological approaches – regarding the used antibody, the immunostaining scoring and the stratification criteria – XIAP added prognostic value to Gleason score and tumor extension [27], in accordance with the results derived from our multivariate analysis. Therefore, our results add support to previous findings that XIAP may be useful as a predictor of prostate cancer progression, which strongly warrants validation in large prospective studies.

In addition to observations derived from functional studies, the fact that XIAP expression positively associates with a favorable prognosis in some cancers has led to question the pro-tumor role of this IAP. Some authors have argued that this controversy could lie in the initial studies on the anti-apoptotic role of XIAP, which are based on its overexpression in cell lines and the short-term response to different pro-apoptotic stimuli [28]. Thus, when XIAP is stably overexpressed in cell lines at levels comparable to those of tumor cells, it does not protect from apoptosis induced by commonly used chemotherapeutic agents [28]. It has even been recently

Table 7 Multivariate Cox proportional hazard regression analysis for time to biochemical progression of XIAP, procaspase-3 and cleaved caspase-3

	<i>p</i>	HR (95 % CI)
A		
Gleason score	0.023*	1.781 (1.083-2.928)
Pathological T stage	0.035*	1.805 (1.042-3.128)
XIAP	0.042*	0.436 (0.196-0.971)
B		
Gleason score	0.020*	1.847 (1.104-3.091)
Pathological T stage	0.176	1.470 (0.842-2.568)
Pro-caspase-3	0.009*	0.268 (0.100-0.718)
C		
Gleason score	0.007*	2.093 (1.220-3.592)
Pathological T stage	0.001*	2.557 (1.441-4.537)
Cleaved caspase-3	0.000*	0.213 (0.099-0.458)

Abbreviations: CI confidence interval, HR hazard ratio. **p* < 0.05

demonstrated that XIAP is able to mediate cell death through mitochondrial outer membrane permeabilization upon cell detachment [29] or stimulation with resveratrol [30]. It is likely that XIAP functions as an anti- or pro-apoptotic factor, or that is neutral, depending on the scenario. More studies are needed to elucidate the mechanisms accounting for its possible anti-tumor role in patients and its potential as a therapeutic target.

The existing studies on the predictive value of caspases in prostate cancer have focused on assessing the association between the presence of allelic variants of genes encoding for these proteins and the risk of disease or the response to therapy [31, 32]. In the present work, we found that negative expression of either procaspase-3 or cleaved caspase-3 strongly associated with an earlier biochemical progression. As demonstrated in the multivariate Cox models, the prognostic capability of both caspase-3 forms was independent on established prognostic factors – Gleason score and pathological T stage – indicating that they may help to identify patients at high risk of progression. Among the executioner caspases, caspase-3 is thought to be the most determinant in integrating the pro-apoptotic signals coming from both extrinsic and the intrinsic pathways, and ultimately, in triggering the activation of the apoptotic program [3]. Therefore, it is tentative to speculate from our observations that suppression of caspase-3 expression profoundly enhances the survival capability of prostate cancer cells, thus contributing to prostate cancer progression. Strategies aimed to restore or enhance expression of caspases, such as the use of either demethylating agents [33] or the adenovirus-mediated transfer of inducible caspases [34], may be effective for prostate cancer treatment, particularly in those patients lacking tumor caspase-3 expression.

Conclusions

In summary, we found that tumor expression of cIAP1/2, cIAP2, Survivin, procaspase-8, cleaved caspase-8, procaspase-3 and caspase-7 expression correlates with clinicopathological features of prostate cancer, indicating that these proteins may constitute markers of local disease. Moreover, negative tumor expression of XIAP, procaspase-3 or cleaved caspase-3 predicted early biochemical progression after radical prostatectomy, both alone and after adjusting for the effects of Gleason score and pathological T stage. This adds significance to a previous study evaluating the prognostic capability of XIAP in prostate cancer and others indicating an anti-tumor role for this IAP. Our findings also support the idea that loss of caspase-3 expression in prostate cancer cells strongly decreases their sensitivity to apoptosis, thus contributing to prostate cancer progression. XIAP, procaspase-3 and cleaved caspase-3 may improve the

accuracy of the existing markers to predict biochemical progression after radical prostatectomy. Prospective studies in larger cohorts of patients are needed to confirm their prognostic utility.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

GR and MR designed the study and carried out the immunohistochemistry and statistical analyses. MG performed the clinical follow-up of the patients. NT and MO created the figures. PM, BF and GO prepared and provided the tumor biological samples and participated in the immunohistochemistry analysis. GR, NT, MO and BF edited the paper and commented on the interpretation of the results. MR and RP participated in study coordination and supervision. All authors read, discussed and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work has been supported by grants from "Instituto de Salud Carlos III" (PI13/1801), Spain. Gonzalo Rodríguez Berriguete had a predoctoral fellowship from the University of Alcalá during the course of this work.

Author details

¹Department of Biomedicine and Biotechnology, University of Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain. ²Department of Pathology, Príncipe de Asturias Hospital, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain. ³Department of Urology, Príncipe de Asturias Hospital, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

Received: 8 June 2015 Accepted: 23 October 2015

Published online: 27 October 2015

References

- Swanson GP, Basler JW. Prognostic factors for failure after prostatectomy. *J Cancer*. 2010;2:1–19.
- Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008;27(48):6194–206.
- Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Luthi AU, Gerner C, Martin SJ. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(35):12815–9.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
- Rodríguez-Berriguete G, Galvis L, Fraile B, de Bethencourt FR, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, et al. Immunoreactivity to caspase-3, caspase-7, caspase-8, and caspase-9 forms is frequently lost in human prostate tumors. *Hum Pathol*. 2012;43(2):229–37.
- Hsia JY, Chen CY, Chen JT, Hsu CP, Shai SE, Yang SS, et al. Prognostic significance of caspase-3 expression in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2013;29(1):44–8.
- Pingoud-Meier C, Lang D, Janss AJ, Rorke LB, Phillips PC, Shalaby T, et al. Loss of caspase-8 protein expression correlates with unfavorable survival outcome in childhood medulloblastoma. *Clin Cancer Res*. 2003;9(17):6401–9.
- Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ, Wiewrodt BR, Ho R, Ikegaki N, et al. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (trail)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res*. 2001;61(4):1314–9.
- Fulda S, Kufer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene*. 2001;20(41):5865–77.
- Gyrd-Hansen Mand Meier P. IAPs: From caspase inhibitors to modulators of nf-kappab, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(8):561–74.
- Church DN, Talbot DC. Survivin in solid tumors: Rationale for development of inhibitors. *Curr Oncol Rep*. 2012;14(2):120–8.
- Nemoto T, Kitagawa M, Hasegawa M, Ikeda S, Akashi T, Takizawa T, et al. Expression of IAP family proteins in esophageal cancer. *Exp Mol Pathol*. 2004;76(3):253–9.
- Endo T, Abe S, Seidler HB, Nagaoka S, Takemura T, Utsuyama M, et al. Expression of IAP family proteins in colon cancers from patients with different age groups. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53(9):770–6.
- Espinosa M, Cantú D, Herrera N, Lopez CM, De la Garza JG, Maldonado V, et al. Inhibitors of apoptosis proteins in human cervical cancer. *BMC Cancer*. 2006;6:45.
- Rodríguez-Berriguete G, Fraile B, de Bethencourt FR, Prieto-Folgado A, Bartolome N, Nunez C, et al. Role of IAPs in prostate cancer progression: Immunohistochemical study in normal and pathological (benign hyperplastic, prostatic intraepithelial neoplasia and cancer) human prostate. *BMC Cancer*. 2010;10:18.
- Cheng L, Montironi R, Bostwick DG, Lopez-Beltran A, Berney DM. Staging of prostate cancer. *Histopathology*. 2012;60(1):87–117.
- Epstein JI, Allsbrook Jr WC, Amin MB, Egevad LL. The 2005 international society of urological pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(9):1228–42.
- Frisch SM. Caspase-8: Fly or die. *Cancer Res*. 2008;68(12):4491–3.
- Finlay D, Howes A, Vuori K. Caspase-8 as a potential mediator of pro-tumorigenic signals. *Cell Cycle*. 2009;8(21):3441–2.
- Helper B, Boswell BC, Finlay D, Cipres A, Vuori K, Bong Kang T, et al. Caspase-8 promotes cell motility and calpain activity under nonapoptotic conditions. *Cancer Res*. 2006;66(8):4273–8.
- Bergmann A, Steller H. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Sci Signal*. 2010;3(145):re8.
- Takata T, Tanaka F, Yamada T, Yanagihara K, Otake Y, Kawano Y, et al. Clinical significance of caspase-3 expression in pathologic-stage I, nonsmall-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2001;96(Suppl):54–60.
- Strater J, Herter I, Merkel G, Hinz U, Weitz J, Moller P. Expression and prognostic significance of apaf-1, caspase-8 and caspase-9 in stage II/III colon carcinoma: Caspase-8 and caspase-9 is associated with poor prognosis. *Int J Cancer*. 2010;127(4):873–80.
- Ferreira CG, van der Valk P, Span SW, Ludwig I, Smit EF, Kruyt FA, et al. Expression of x-linked inhibitor of apoptosis as a novel prognostic marker in radically resected non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2001;7(8):2468–74.
- Aggarwal BB, Ichikawa H. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle*. 2005;4(9):1201–15.
- Hwang C, Oetjen KA, Kosoff D, Wojno KJ, Albertelli MA, Dunn RL, et al. X-linked inhibitor of apoptosis deficiency in the tramp mouse prostate cancer model. *Cell Death Differ*. 2008;15(5):831–40.
- Seligson DB, Hongo F, Huerta-Yepez S, Mizutani Y, Miki T, Yu H, et al. Expression of x-linked inhibitor of apoptosis protein is a strong predictor of human prostate cancer recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;13(20):6056–63.
- Kashkar H. X-linked inhibitor of apoptosis: a chemoresistance factor or a hollow promise. *Clin Cancer Res*. 2010;16(18):4496–502.
- Owens TW, Foster FM, Valentijn A, Gilmore AP, Streuli CH. Role for x-linked inhibitor of apoptosis protein upstream of mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem*. 2010;285(2):1081–8.
- Gogada R, Prabhu V, Amadori M, Scott R, Hashmi S, Chandra D. Resveratrol induces p53-independent, x-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated Bax protein oligomerization on mitochondria to initiate cytochrome c release and caspase activation. *J Biol Chem*. 2011;286(33):28749–60.
- Huang SP, Bao BY, Hour TC, Huang CY, Yu CC, Liu CC, et al. Genetic variants in casp3, bmp5, and irs2 genes may influence survival in prostate cancer patients receiving androgen-deprivation therapy. *PLoS One*. 2012;7(7):e41219.
- Mittal RD, Mittal T, Singh AK, Mandal RK. Association of caspases with an increased prostate cancer risk in north Indian population. *DNA Cell Biol*. 2012;31(1):67–73.
- Cangemi R, Mensah A, Albertini V, Jain A, Mello-Grand M, Chiorino G, et al. Reduced expression and tumor suppressor function of the ets transcription factor *ese-3* in prostate cancer. *Oncogene*. 2008;27(20):2877–85.
- Shariat SF, Desai S, Song W, Khan T, Zhao J, Nguyen C, et al. Adenovirus-mediated transfer of inducible caspases: a novel "death switch" gene therapeutic approach to prostate cancer. *Cancer Res*. 2001;61(6):2562–71.

Epidermal growth factor induces p38 MAPK-dependent G0/G1-to-S transition in prostate cancer cells upon androgen deprivation conditions

Gonzalo Rodríguez-Berriguete, Norelia Torrealba, Benito Fraile, Ricardo Paniagua & Mar Royuela

To cite this article: Gonzalo Rodríguez-Berriguete, Norelia Torrealba, Benito Fraile, Ricardo Paniagua & Mar Royuela (2016): Epidermal growth factor induces p38 MAPK-dependent G0/G1-to-S transition in prostate cancer cells upon androgen deprivation conditions, Growth Factors, DOI: [10.3109/08977194.2015.1132712](https://doi.org/10.3109/08977194.2015.1132712)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.3109/08977194.2015.1132712>



Published online: 16 Feb 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

RESEARCH PAPER

Epidermal growth factor induces p38 MAPK-dependent G₀/G₁-to-S transition in prostate cancer cells upon androgen deprivation conditions

Gonzalo Rodríguez-Berriguete, Norelia Torrealba, Benito Fraile, Ricardo Paniagua, and Mar Royuela

Department of Biomedicine and Biotechnology, University of Alcalá, Alcalá De Henares, Madrid, Spain

Abstract

Epidermal growth factor (EGF) is thought to contribute to the emergence of castration-resistant (CR) prostate tumors by inducing proliferation of cancer cells despite the low levels of circulating androgens achieved by androgen deprivation therapy. We show that, in LNCaP cells, androgen deprivation induces arrest in the G₀/G₁ cell cycle phase, and that EGF partially rescues this arrest without affecting cell death. Inhibition of p38 MAPK, but not MEK or IKK-β, completely abrogates the EGF-induced proliferation of LNCaP cells in androgen-depleted medium, and decreases the fraction of G₀/G₁-arrested cells. Our results suggest that EGF enables prostate cancer cells to overcome the growth restriction imposed by androgen deprivation by stimulating G₀/G₁-to-S transition via p38 MAPK. These results suggest the potential of developing therapies for advanced prostate cancer that block the G₀/G₁ to S transition, such as by targeting p38 MAPK, or that aim to induce apoptosis in G₀/G₁-arrested cancer cells.

Keywords

Prostate cancer, castration resistance, proliferation, cell cycle, EGF, p38 MAPK

History

Received 23 October 2015
Revised 12 December 2015
Accepted 13 December 2015
Published online 11 February 2016

Introduction

Prostate cancer remains a leading cause of cancer-related death in Western countries (Jemal et al., 2011). Androgen deprivation therapy (ADT) constitutes the first-line treatment for metastatic prostate cancer (Sharifi et al., 2010). Androgen depletion causes tumor regression owing to its ability to induce apoptosis and cell proliferation arrest of prostate cancer cells (Agus et al., 1999). In spite of a frequent initial dramatic response to ADT for metastatic disease, in almost all patients tumors arise that are resistant to low circulating androgen levels at 2–3 years, in a phenomenon called castration resistance (CR), leading to death in virtually all patients in 16–18 months (Pienta & Bradley, 2006). Therefore, elucidation of the processes that drive prostate cancer cells to become resistant to ADT is a major challenge for cancer research.

CR tumors must contain cancer cells that survive and proliferate despite circulating castration levels of androgens. Several mechanisms have been proposed to explain the emergence of ADT-resistant tumors (Feldman & Feldman, 2001; Pienta & Bradley, 2006; Ponguta et al., 2008; Tombal,

2011), including: (a) upregulation of androgen receptor (AR); (b) mutations in AR; (c) increased synthesis of androgens by tumor cells; (d) ligand-independent activation of AR by growth factors or cytokines; (e) AR-independent processes triggered by mutations or extracellular signals; or (f) tumor cell repopulation supported by androgen-independent prostate cancer stem cells.

Auto/paracrine peptidic signals that activate tyrosine kinase receptors are thought to contribute to CR emergence, by activating signaling pathways in prostate cancer cells which circumvent androgen requirement to survive and/or proliferate (Feldman & Feldman, 2001; Pienta & Bradley, 2006). For example, epidermal growth factor (EGF) has been shown to induce proliferation of prostate cancer cell lines in the absence of androgens, through AR-dependent and independent pathways (Culig et al., 1994; MacDonald & Habib, 1992; Ponguta et al., 2008; Sherwood et al., 1998). In support of the role of EGF in CR prostate cancer, the EGF receptors EGFR (HER-1) and HER-2/neu are overexpressed in CR and metastatic prostate tumors, and have been correlated with poor patient outcome (Hernes et al., 2004; Lorenzo et al., 2002; Zellweger et al., 2005).

How EGF is able to promote CR prostate cancer cell growth and the mediators involved in this process remain poorly known. Upon androgen withdrawal, prostate cancer cells arrest in G₁ phase associated to changes in G₁-phase regulatory elements, both in *in vitro* and *in vivo* models (Agus et al., 1999; Knudsen et al., 1998). In the present work, we investigated whether EGF is able to stimulate G₁-to-S cell

Correspondence: Mar Royuela, Department of Biomedicine and Biotechnology, University of Alcalá, Alcalá de Henares 28871, Madrid, Spain. Tel: +0034 91885 4799. E-mail: mar.royuela@uah.es

cycle-phase transition, thus mimicking the effect of androgens and enabling prostate cancer cells to overcome the androgen deprivation-induced growth restriction, and the mediators involved in this process.

Materials and methods

Reagents

All components for cell culture were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). Recombinant human EGF was obtained from Peprotech (Paris, France). The p38 MAPK inhibitor SB203580, the IKK- β inhibitor PS1145, and the MEK inhibitor PD98059 were obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Goat polyclonal anti-p-Rb antibody (Thr 821/826) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Cell line and treatments

LNCaP cells, purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics, in a humidified 5%-CO₂ atmosphere at 37 °C. As a rule, treatments were initiated at least 24 h after seeding, to ensure proper cell attachment and exponential growth.

At time of treatment, the medium was removed, wells were washed with phosphate buffered saline (PBS), and medium containing 10% charcoal-stripped FBS (CS-FBS) was added to simulate androgen withdrawal (Shen et al., 1997), with or without addition of recombinant human EGF. In some experiments, chemical inhibitors SB203580, PD98059, and PS1145 were applied 4 h in advance to treatments. The medium was removed and replaced with fresh medium containing the treatments every 72 h.

MTT assay

Cells were seeded in 96-well plates at 5×10^3 cells/well. At the end of treatments, the medium was removed and 200 μ l of serum-free, red phenol-lacking RPMI medium containing 0.25 mg/ml of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) was added. After 4-h incubation at 37 °C, SDS was added to a final concentration of 3% to dissolve the formazan crystals. Dye absorbance was measured by spectrometry at 570 nm using a microplate reader.

Determination of cell cycle distribution and cell death

Cells were seeded in 6-well plates at 1.5×10^5 cells/well. At the end of the experiments, detached and adherent cells harvested by trypsinization were collected together, centrifuged, and re-suspended in cold PBS. To determine cell cycle distribution, cells were permeabilized with 0.1% v/v Nonidet P-40, incubated for 20 min at room temperature in the presence of 0.01-mg/ml RNase and 40 mg/ml of propidium iodide (PI), and analyzed by flow cytometry. To determine cell death based on plasma membrane disruption, nonpermeabilized cells were directly incubated with 40-mg/ml PI, and examined by flow cytometry. Cells with free PI penetration were considered as death.

All flow cytometry data were analyzed using WinMDI software (Scripps Institute, La Jolla, CA). To calculate cell cycle distribution, histograms were further analyzed with Cylchred software (Cardiff University, Cardiff, UK).

Cell lysates preparation and western blotting

Floating and scraped adherent cells were collected together, pelleted by centrifugation, and washed with PBS. The cells were lysed by incubation for 20 min on ice in 60 ml of lysis buffer [1% (v/v) NP-40 and 10% (v/v) glycerol in 20-mM Tris-HCl pH 7.5] supplemented with a protease inhibitor cocktail, 1 mM of sodium orthovanadate, and 10 mM of sodium fluoride. Extracts containing equal protein amounts were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, blotted into membranes and immunodetected, as previously described (Ramos et al., 2006).

Results

EGF counteracted the suppressive effect of androgen deprivation on LNCaP cell growth

MTT was performed to determine changes in the size of the viable LNCaP cell population. As shown in Figure 1, the growth of LNCaP cells upon androgen deprivation was nearly 1.6-fold lower than that of LNCaP cells cultured in complete medium (CS-FBS vs. FBS alone) at 3 d, and 3.0-fold lower at 6 d. EGF increased the growth of LNCaP cells in a dose-dependent manner upon androgen starvation, reaching a maximum response of near 2-fold after 6 d of treatment with 10 ng/ml of EGF.

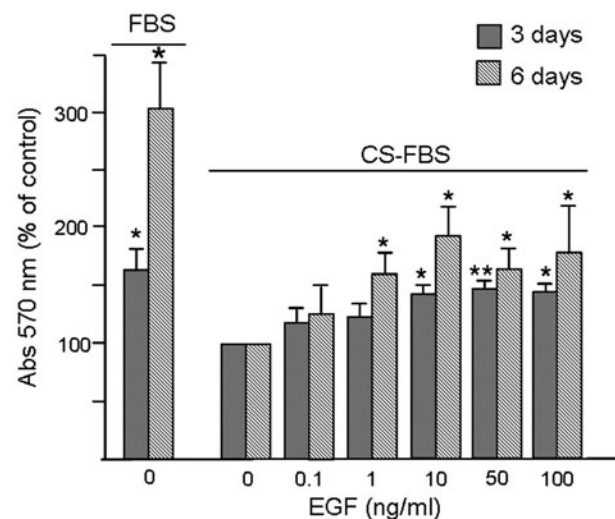


Figure 1. Time- and dose-dependent effect of EGF on LNCaP cell growth. LNCaP cells were exposed to medium containing 10% CS-FBS alone or in combination with the indicated EGF concentrations or were grown in medium supplemented with 10% FBS. Then, the size of the viable cell population was estimated by the MTT assay at the indicated times. The absorption values (mean \pm SD of four independent experiments) are represented in relation to cells treated with CS-FBS alone, which received the value of 100. Asterisks denote statistically significant differences between the indicated conditions and CS-FBS alone (Student's *t*-test: **p* < 0.05; ***p* < 0.005).

Figure 2. Effect of androgen deprivation and EGF on cell death of LNCaP cells. LNCaP cells were grown in medium supplemented with 10% FBS or were exposed to medium containing 10% CS-FBS alone or in combination with 10 ng/ml EGF. After 3 and 6 d of treatment, loss of plasma membrane integrity was estimated by assessing PI incorporation into the cell by flow cytometry. (A) Percentage of PI-permeable (death) cells (mean \pm SD of three independent experiments). (B) Examples of flow cytometry histograms obtained at 6 d of treatment, in which the fractions of PI-permeable cells are shown.

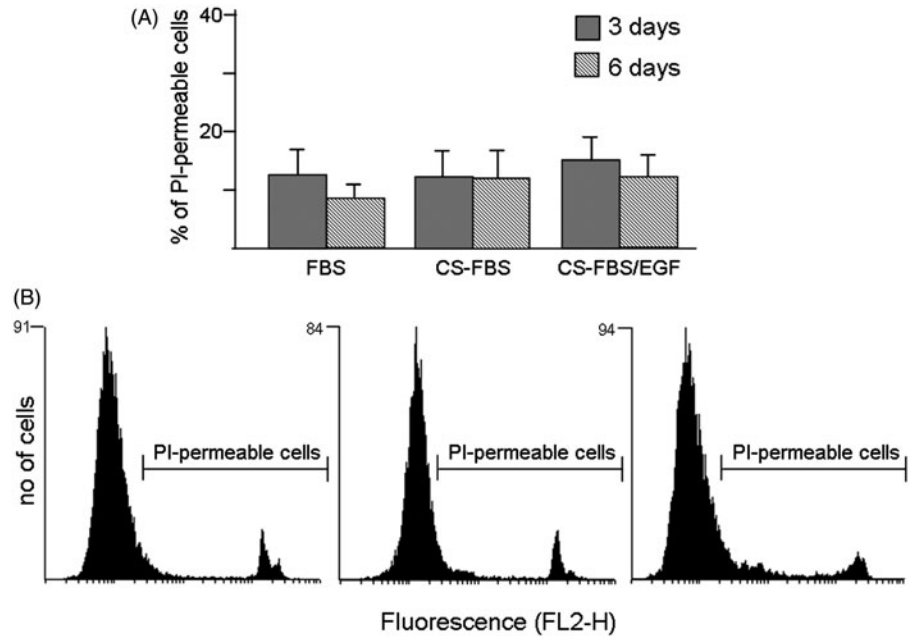
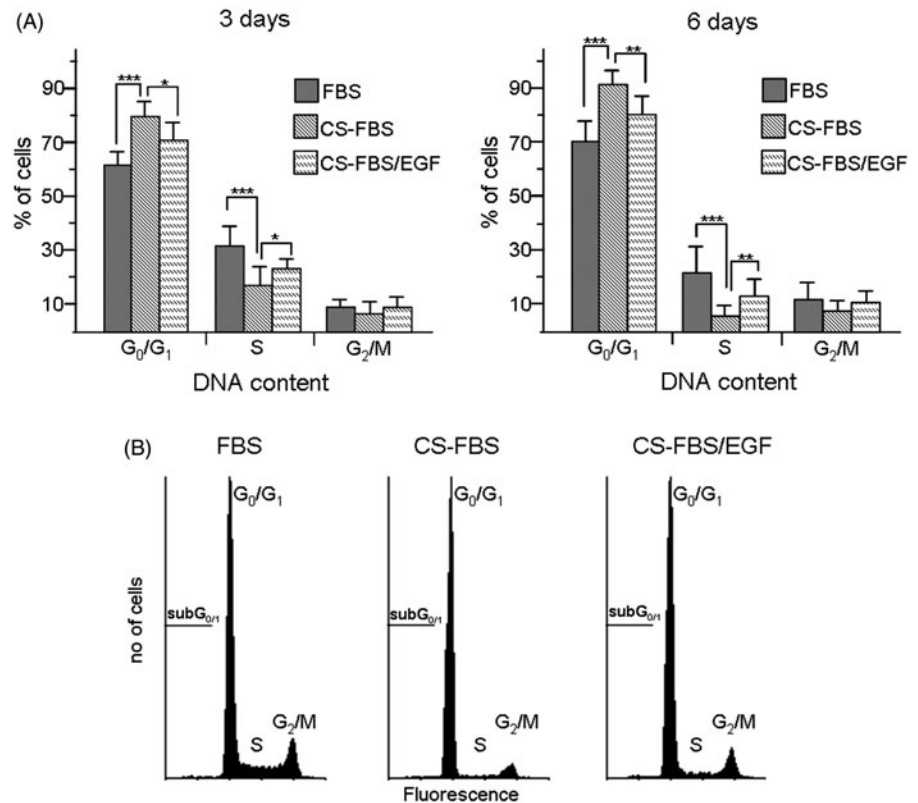


Figure 3. Effect of androgen deprivation and EGF treatment on cell cycle distribution of LNCaP cells. LNCaP cells were grown in medium supplemented with 10% FBS, or were exposed to medium containing 10% CS-FBS alone or in combination with 10 ng/ml of EGF. Cell cycle distribution was estimated according to the DNA content by flow cytometry. (A) Percentage of cells in G_0/G_1 , S, and G_2/M cell cycle phases (mean \pm SD of five independent experiments) at 3 and 6 d of treatment. Asterisks denote significant differences between the indicated pair of values (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$; Student's t -test). (B) Examples of cell cycles profiles at 6 d of treatment. The fractions of cells in the different cell cycle phases and the fractions of apoptotic ($SubG_0/G_1$) cells are indicated.



EGF-induced cell growth of LNCaP cells upon androgen deprivation was associated with a reduction of cell cycle arrest in G_0/G_1 but not with changes in cell death

We next evaluated PI-free cell entry, which is an unequivocal, widely used indicator of cell death due to any mechanism (Kroemer et al., 2009). Treatments did not cause significant changes in the percentage of PI-positive cells (Figure 2), demonstrating that cell death does not account for the

CS-FBS-induced cell growth reduction or the counteracting effect of EGF.

Distribution of cells along the different cell cycle phases was assessed by estimating the cell DNA content by flow cytometry. Upon androgen deprivation, the proportion of LNCaP cells in G_0/G_1 was higher, and the proportion in S lower than those cultured in FBS-supplemented medium (Figure 3). Although there was a trend toward a decreased proportion of G_2/M cells, the difference was not statistically significant. In agreement with a role of EGF in promoting

transition from G₁-to-S phase, EGF treatment buffered the effect of CS-FBS replacement on cell cycle distribution (Figure 3). With the aim of validating our observations derived from the cell cycle assay, we analyzed the levels of the phosphorylated retinoblastoma protein (p-Rb). The retinoblastoma protein (Rb) is known to allow G₁-to-S transition when strongly phosphorylated (Heilmann & Dyson, 2012). As expected, the phosphorylation of Rb on the residues Thr821 and Thr826 was lower in cells cultured in androgen-depleted medium compared to cells growing in FBS-supplemented medium (Figure 5A).

Accordingly with the results shown in Figure 2, no changes were found in the percentage of sub-G₀/G₁ (apoptotic) cells (Figure 3B).

These results strongly support that EGF stimulates CS-FBS-induced G₀/G₁-arrested LNCaP cells to progress through the cell cycle, which resulted in increased proliferation despite low levels of androgens.

p38 MAPK inhibitor SB203580 completely abrogated EGF-induced LNCaP proliferation under androgen-deprived conditions

Two mitogen-activated protein kinases (MAPKs), p38 and ERK, are activated in response to EGF stimulation in LNCaP cells growing in androgen-depleted conditions (Mukherjee & Mayer, 2008). EGF has also been demonstrated to induce proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells via the canonical NF- κ B pathway (Biswas et al., 2000). To gain insights into the molecular players contributing to the proliferative effects of EGF on LNCaP cell growth under androgen-deprived conditions, MTT assays were performed in which the activity of p38 MAPK, MEK (the upstream kinase of ERKs), or IKK- β (the upstream kinase of NF- κ B) was inhibited by applying the chemical compounds SB203580, PD98059, or PS1145, respectively, 4 h in advance to the addition of CS-FBS or CS-FBS plus EGF. When p38 MAPK was inhibited, the effect of EGF on LNCaP cell growth at 6 d was completely abolished, while no significant differences were found when either MEK or IKK- β inhibitors were applied (Figure 4). This indicates that p38 MAPK positively

regulates the proliferation of LNCaP cells in response to EGF under androgen-deprived conditions.

p38 MAPK inhibitor SB203580 inhibited the EGF-induced decrease in the fraction of LNCaP cells arrested in G₀/G₁

To evaluate whether the role of p38 MAPK as a positive regulator of the reported proliferative effects of EGF in LNCaP cells relies on its ability to regulate cell cycle, p38 MAPK inhibitor was added to LNCaP cell cultures 4 h in advance to CS-FBS or CS-FBS plus EGF, and cell cycle distribution was finally assessed by flow cytometry. p38 MAPK inhibition counteracted the EGF-provoked reduction in the fraction of androgen deprivation-induced G₀/G₁-arrested LNCaP cells, completely at 3 d and in a lesser extent at 6 d of treatment (Figure 5B). Accordingly, under androgen depletion, cells treated with EGF and the p38 MAPK inhibitor showed similar levels of Rb phosphorylation than untreated cells (Figure 5A). Moreover, p38 MAPK inhibition did not produce changes in cell death, neither alone nor in combination with EGF (data not shown). These findings indicate that p38 MAPK contributes to EGF-induced proliferation of LNCaP cells under androgen-deprived conditions by promoting G₀/G₁-to-S transition.

Discussion

The ability of prostate tumors to survive and proliferate at low circulating levels of androgens, and thus to achieve CR status, has been explained by multiple mechanisms that are not mutually exclusive (Feldman & Feldman, 2001; Pienta & Bradley, 2006; Tombal, 2011). Our results suggest that EGF is able to support the growth of LNCaP cells under androgen-deprivation conditions, by stimulating p38 MAPK-dependent G₀/G₁-to-S cell-cyclephase transition.

Here, we show that EGF is able to counteract the suppressive effect of androgen deprivation on the growth of LNCaP cells, in accordance with other reports (MacDonald & Habib, 1992; Sherwood et al., 1998). The proportion of cells with altered membrane permeability – as shown by PI incorporation assay – did not significantly vary with CS-FBS

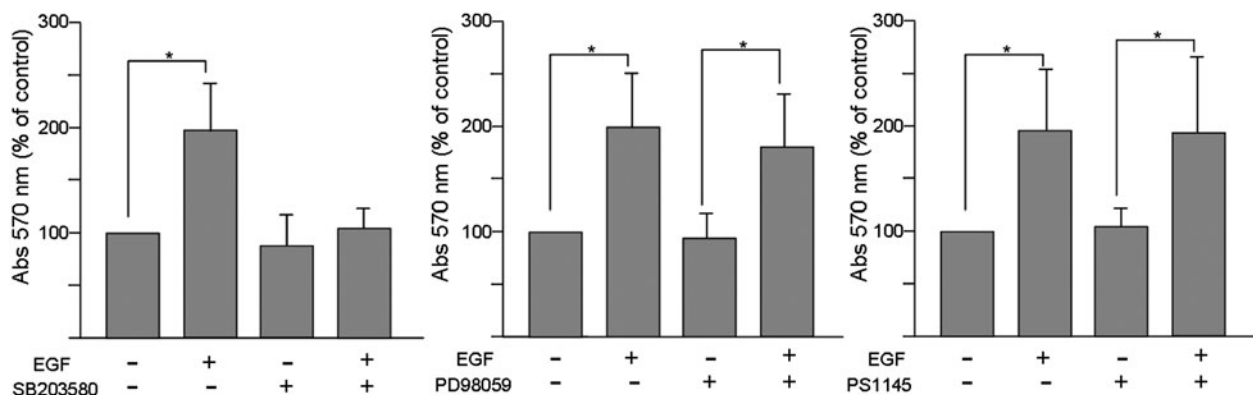


Figure 4. Effect of inhibition of p38 MAPK, MEK, and IKK- β on EGF-induced proliferation of LNCaP cells under androgen-deprived conditions. LNCaP cells were treated with CS-FBS or CS-FBS plus 10 ng/ml EGF. Prior to treatments, cells were incubated for 4 h with 10- μ M SB203580 (p38 MAPK inhibitor), 20- μ M PD98059 (MEK inhibitor), or 10- μ M PS1145 (IKK- β inhibitor). After 6 d, MTT assay was performed to determine the size of the viable cell population. The absorption values (mean \pm SD of three independent experiments) are represented in relation to cells treated with CS-FBS alone, which received the value of 100. Asterisk indicates significant differences between the indicated pair of values ($p < 0.05$; Student's *t*-test).

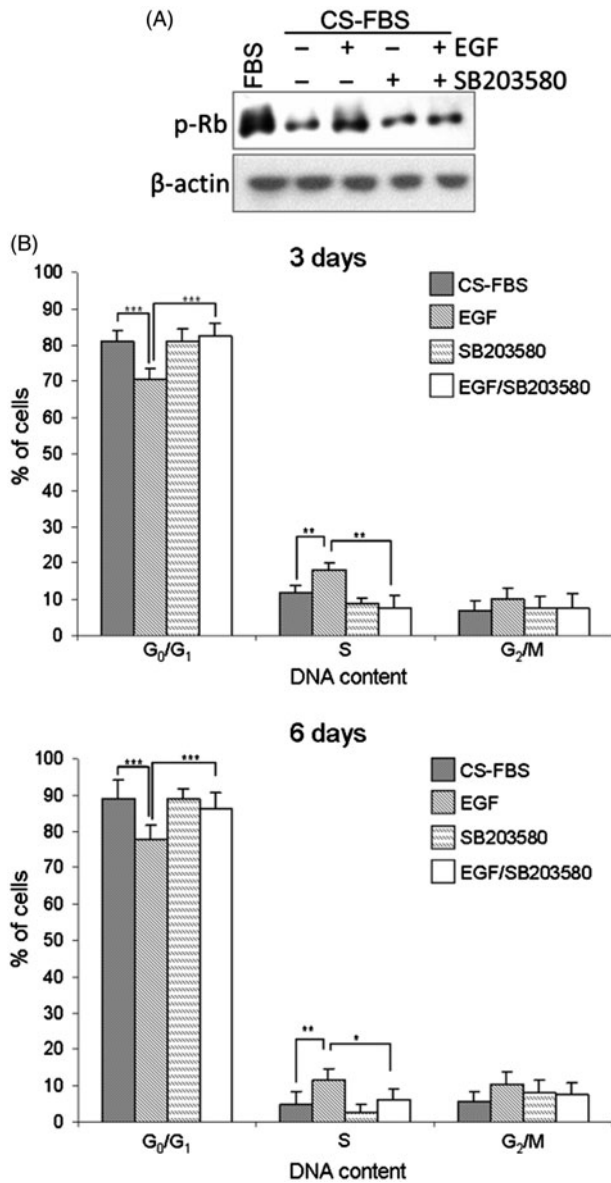


Figure 5. Effect of p38 MAPK inhibition and EGF stimulation on the phosphorylation of Rb and the cell cycle distribution of LNCaP cells under androgen-deprived conditions. LNCaP cells were treated with CS-FBS or CS-FBS plus 10-ng/ml EGF. Prior to treatments, cells were incubated with 10- μ M SB203580 (p38 MAPK inhibitor) for 4 h. (A) Western blot analysis of p-Rb after 3 d of treatment. β -actin was used as a loading control. (B) Cell cycle distribution was estimated according to the DNA content by flow cytometry at 3 and 6 d of treatment. Results are represented as percentage of cells (mean \pm SD of five independent experiments) in G₀/G₁, S, and G₂/M cell cycle phases. Symbols indicate significant differences between the indicated pair of values (* p < 0.05; ** p < 0.005; *** p < 0.001; Student's t -test).

or CS-FBS plus EGF treatments, demonstrating that cell death does not contribute to the changes in the population of viable LNCaP cells shown in MTT assays. Instead, the proliferative effects of EGF were accompanied by a reduction in the fraction of cells in G₀/G₁, and an increase in the fraction of cells in S phase, indicating that EGF exerts its proliferative action mainly by promoting G₁-to-S phase transition. The fact that the reduction in the proportion of G₂/M cells upon androgen withdrawal was not statistically significant could be explained by an arrest of the small fraction of tetraploid cells in G₀/G₁, which overlaps with the diploid G₂/M peak and, in

consequence, is likely masking a more pronounced G₂/M decrease.

These findings implicating cell cycle arrest in tumor regression after ADT contrast with initial proposals that this regression is mediated exclusively through apoptotic cell death (Agus et al., 1999). Instead, our results are consistent with several other studies establishing a role for cell cycle arrest. In a mouse model of xenografted prostate cancer, after castration, tumor cells exhibited changes in G₁ cell cycle regulatory proteins, with absence of apoptosis, and associated to decreased proliferation, indicating that androgen withdrawal causes cell cycle arrest in G₁ phase (Agus et al., 1999). Similarly, Knudsen et al. (1998) found that androgen removal produces specific G₁ arrest in LNCaP cells growing *in vitro*, linked to changes which have been associated to G₁-to-S transition repression, such as diminution in the hyperphosphorylated species of Rb and p130, or suppression of activity of cyclin-dependent kinase (CDK)4 and CDK2.

MAPKs are signals transducers which are thought to have an important role in prostate cancer, through their effects on a broad range of cell functions, including death/survival, proliferation, and differentiation (Rodriguez-Berriguete et al., 2012). Two MAPKs transduction pathways, the p38 MAPK and MEK/ERK cascades, are known to be activated in response to EGF stimulation in LNCaP cells growing in androgen-starved medium (Mukherjee & Mayer, 2008). In contrast, in breast cancer (another hormone-related malignance), EGF-induced activation of the IKK/NF- κ B pathway has been demonstrated to contribute to the growth autonomy of estrogen receptor-negative cells, most likely by promoting G₁-to-S progression (Biswas et al., 2000). In the present study, inhibition of p38 MAPK, but not MEK or IKK- β , completely abrogated the EGF-induced proliferation of LNCaP cells in androgen-deprived conditions. Such an effect seems to be mostly caused by blockade of the EGF-induced G₀/G₁-to-S transition, since percentage of cells along the different cell cycle phases was maintained practically at control (androgen deprivation) levels. Further evidence was provided with the assessment of Rb phosphorylation, which is determinant for G₁-to-S transition (Heilmann & Dyson, 2012).

Therefore, p38 MAPK seems to be a critical mediator in the induction of G₀/G₁-to-S transition by EGF under androgen withdrawal. It has been demonstrated that p38 MAPK is capable of phosphorylate and activate AR in response to EGF in a ligand-independent fashion in LNCaP cells (Mukherjee & Mayer, 2008). Similarly, p38 MAPK has been shown to increase AR activation and/or expression in response to other stimuli in absence of androgens, like interleukin (IL)-6 (Lin et al., 2001) or hypoxia (Khandrika et al., 2009). Altogether, these results suggest that different stimuli use p38 MAPK signaling as a common element driving androgen-independent prostate cancer cell proliferation, which could involve important therapeutic implications.

We provide the first evidence that EGF can mimic the effect of androgens on the cell cycle of prostate cancer cells, since it is able to promote cell cycle progression from G₀/G₁-to-S phase. We also demonstrated the requirement of p38 MAPK activity in this process. Therefore, EGF – as well as other peptidic ligands – could contribute to the emergence of

CR tumors by allowing androgen deprivation-induced G₀/G₁-arrested prostate cancer cells to progress through the cell cycle and proliferate. We hypothesize that therapies aimed to block G₀/G₁-to-S transition, possibly targeting p38 MAPK, and/or to induce apoptosis in G₀/G₁-arrested cancer cells could improve ADT or be successful for treatment of CR prostate cancer.

Declaration of interest

The authors have no conflict of interest. This work was funded by the ‘‘Instituto de Salud Carlos III’’ (PI13/01801) of Spain. G.R.B. had a predoctoral fellowship from the University of Alcalá during the course of this work.

References

Agus DB, Cordon-Cardo C, Fox W, Drobnjak M, Koff A, Golde DW, Scher HI. 1999. Prostate cancer cell cycle regulators: Response to androgen withdrawal and development of androgen independence. *J Natl Cancer Inst* 91:1869–1876.

Biswas DK, Cruz AP, Gansberger E, Pardee AB. 2000. Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8542–8547.

Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, Bartsch G, Klocker H. 1994. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res* 54:5474–5478.

Feldman BJ, Feldman D. 2001. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1:34–45.

Heilmann AM, Dyson NJ. 2012. Phosphorylation puts the pRb tumor suppressor into shape. *Genes Dev* 26:1128–1130.

Hernes E, Fossa SD, Berner A, Otnes B, Nesland JM. 2004. Expression of the epidermal growth factor receptor family in prostate carcinoma before and during androgen-independence. *Br J Cancer* 90:449–454.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69–90.

Khandrika L, Lieberman R, Koul S, Kumar B, Maroni P, Chandhoke R, Meacham RB, Koul HK. 2009. Hypoxia-associated p38 mitogen-activated protein kinase-mediated androgen receptor activation and increased HIF-1alpha levels contribute to emergence of an aggressive phenotype in prostate cancer. *Oncogene* 28:1248–1260.

Knudsen KE, Arden KC, Cavenee WK. 1998. Multiple G1 regulatory elements control the androgen-dependent proliferation of prostatic carcinoma cells. *J Biol Chem* 273:20213–20222.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. 2009. Classification of cell

death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16:3–11.

Lin DL, Whitney MC, Yao Z, Keller ET. 2001. Interleukin-6 induces androgen responsiveness in prostate cancer cells through up-regulation of androgen receptor expression. *Clin Cancer Res* 7:1773–1781.

Lorenzo G, Tortora DG, D’Armiento FP, Rosa G, Staibano D, Autorino S, D’Armiento RM, et al. 2002. Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 8:3438–3444.

MacDonald A, Habib FK. 1992. Divergent responses to epidermal growth factor in hormone sensitive and insensitive human prostate cancer cell lines. *Br J Cancer* 65:177–182.

Mukherjee B, Mayer D. 2008. Dihydrotestosterone interacts with EGFR/MAPK signalling and modulates EGFR levels in androgen receptor-positive LNCaP prostate cancer cells. *Int J Oncol* 33:623–629.

Pienta KJ, Bradley D. 2006. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 12:1665–1671.

Ponguta LA, Gregory CW, French FS, Wilson EM. 2008. Site-specific androgen receptor serine phosphorylation linked to epidermal growth factor-dependent growth of castration-recurrent prostate cancer. *J Biol Chem* 283:20989–21001.

Ramos AM, Fernandez C, Amran D, Esteban D, de Blas E, Palacios MA, Aller P. 2006. Pharmacologic inhibitors of extracellular signal-regulated kinase (ERKs) and c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) decrease glutathione content and sensitize human promonocytic leukemia cells to arsenic trioxide-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 209:1006–1015.

Rodríguez-Berriguete G, Fraile B, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, Paniagua R, Royuela M. 2012. MAP Kinases and Prostate Cancer. *J Signal Transduct* 2012:169170.

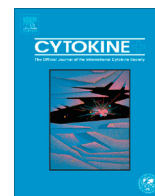
Sharifi N, Gulley JL, Dahut WL. 2010. An update on androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 17:R305–R315.

Shen R, Dorai T, Szaboles M, Katz AE, Olsson CA, Buttyan R. 1997. Transdifferentiation of cultured human prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in a hormone-depleted medium. *Urol Oncol* 3:67–75.

Sherwood ER, Van Dongen JL, Wood CG, Liao S, Kozlowski JM, Lee C. 1998. Epidermal growth factor receptor activation in androgen-independent but not androgen-stimulated growth of human prostatic carcinoma cells. *Br J Cancer* 77:855–861.

Tombal B. 2011. What is the pathophysiology of a hormone-resistant prostate tumour? *Eur J Cancer* 47:S179–S188.

Zellweger T, Ninck C, Bloch M, Mirlacher M, Koivisto PA, Helin HJ, Mihatsch MJ, et al. 2005. Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. *Int J Cancer* 113:619–628.



Expression of several cytokines in prostate cancer: Correlation with clinical variables of patients. Relationship with biochemical progression of the malignance



Norelia Torrealba^{a,1}, Gonzalo Rodríguez-Berriguete^{a,1}, Benito Fraile^a, Gabriel Olmedilla^b, Pilar Martínez-Onsurbe^b, Manuel Guil-Cid^c, Ricardo Paniagua^a, Mar Royuela^{a,*}

^a Department of Biomedicine and Biotechnology, University of Alcalá, Spain

^b Department of Pathology, Príncipe de Asturias Hospital, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

^c Department of Urology, Príncipe de Asturias Hospital, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 October 2015
Received in revised form 12 July 2016
Accepted 8 August 2016
Available online 12 August 2016

Keywords:

IL-1
IL-6
EGF
TNF- α
TGF- β and prostate cancer

ABSTRACT

Background: This work is focused on finding new markers that complement or diagnoses currently used towards improving knowledge histological and statistical aspects that allow us to predict the local stage carcinomas and to identify and understand all the factors related to the progression of this disease.

Materials and methods: Prostates were obtained from: normal prostates from 20 men, diagnosis of BPH (Benign Prostatic Hyperplasia) from 35 men and prostate cancer from 86 men. We studied the behavior of cytokines that have been implicated in inflammatory processes: TNF- α , IL-6, IL-1, EGF and TGF- β . Expression of these cytokines and its receptors was analyzed by immunohistochemistry. Spearman's test, Kaplan-Meier curves, univariate and multivariate Cox proportional hazard regression analyses were performed.

Results: Spearman's analysis showed that there was at least one correlation between TGF- β , IL-6, gp-130, IL-1 β , IL-1 α , IL-1 R^{I} , IL-1 R^{II} and clinic pathological feature (preoperative serum PSA, clinical t stage, pathological t stage, positive surgical margins, biochemical progression, survival). Immunostaining score was correlated with some of the clinicopathological feature. In Cox multivariate analysis between the prognostic variables (pathological T stage, Gleason score and lymph node) and immunohistochemical parameters (TGF- β , IL-1 α , intensity TGF- β RI and intensity TGF- β RII) only the expression of IL-1 α was retained as independent predictors of biochemical progression after radical prostatectomy.

Conclusions: Our results suggest a role for prostatic expression of TGF- β , IL-1 α , TGF- β RI and TGF- β RII as prognostic markers for prostate cancer. The rational combination of novel agents directed toward the inactivation of TGF- β , IL-1 α , TGF- β RI and TGF- β RII could disrupt complementary tumor cell proliferation pathways.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Prostate cancer is one of the most commonly diagnosed malignancies in males. Etiopathologic factors are diverse and it is essential to develop therapies useful in early treatment. Inflammation

has been suggested as a causal factor in several human tumors, including prostate cancer. Among the factors described to be involved in inflammatory processes, pro-inflammatory (TNF- α , IL-6, IL-1) and anti-inflammatory (EGF and TGF- β) cytokines play an important role in the activation of different transduction pathways related with carcinogenesis [1].

The function of tumor necrosis factor α (TNF- α) in tumor tissues is determined by different intracellular signals triggered upon its arrival at the cell surface of its membrane receptors (tumor necrosis factor receptor: TNFRI and TNFRII). The expression and functionality of TNF- α and its receptors have been studied in different tumors such as esophageal [2], prostate [3], thyroid follicle [4] and breast [5] cancers.

* Corresponding author at: Department of Biomedicine and Biotechnology, University of Alcalá, E-28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

E-mail addresses: engastediamente@gmail.com (N. Torrealba), gonzalo_rb@hotmail.es (G. Rodríguez-Berriguete), benito.fraile@uah.es (B. Fraile), golmedilla.hupa@salud.madrid.org (G. Olmedilla), mmonsurbes@salud.madrid.org (P. Martínez-Onsurbe), manuelesteban.guil@salud.madrid.org (M. Guil-Cid), Ricardo.paniagua@uah.es (R. Paniagua), mar.royuela@uah.es (M. Royuela).

¹ These authors contributed equally to the present work.

Interleukin 1 (IL-1) comprises two ligands (IL-1a and IL-1B), which bind to two types of transmembrane interleukin 1 receptors (IL-1RI and IL-1RII), and there is also a specific interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra). IL-1a has also been implicated in the promotion of angiogenesis, induction of cascade of other pro-inflammatory molecules, tumor growth, and metastasis in experimental cancer models, being associated with more aggressive tumor biology [6]. Interestingly, Sakurai et al. [7] reported reduced hepatocellular carcinoma development with the inhibition of IL-1a or the ablation of IL-1RI.

The predictive value of members of the TNF- α and IL-1a signaling pathways has been assessed in several human malignancies. IL-1B gene variants have been shown to predict outcome in colon cancer [8], and have been associated with risk of lung [9], gastric [10] and prostate [11] cancer.

Interleukin 6 (IL-6) exerts its biological activity through a membrane receptor complex constituted by IL-6 receptor α (IL-6R α) and glycoprotein 130 (gp-130). First, IL-6 binds to IL-6R α , which is unable to initiate signal transduction, and this complex attracts gp-130 molecules, which dimerize leading to the intracellular signal [12]. This complex is involved in tumor growth and malignant differentiation of cancer cells. Moreover, IL-6 has been found to be overexpressed in several tumors, such as melanoma [13], lung [9], breast [7], prostate [14], and bone [15] cancers and has prognostic significance [16].

Epidermal Growth Factor (EGF) initiates its signaling by binding to the extracellular domain of the receptor ErbB [17]. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is the predominant ErbB receptor expressed in normal adult mammalian cells and on the cell membrane of cancer cells; and its signaling axis is implicated in tumor progression. EGF has been associated with prostate cancer aggressiveness and progression-free interval in androgen blockade-treated patients [18] whereas expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer [19].

Transforming growth factor B (TGF-B) regulates proliferation, differentiation, development, angiogenesis, wound healing and many other processes in different cell types [20]. TGF-B binds two receptors (TGFBR1 and TGFBR2), and then initiates a cascade of phosphorylations which subsequently activates different intracellular signaling pathways [21]. Overexpression of TGF-B and its receptors has been described in various types of human cancer, which correlates with tumor progression, metastasis, angiogenesis and poor prognostic outcome. TGF-B1 expression may be useful clinic pathological features for prostate cancer [22].

The aim of the present study was to investigate the prognostic value for biochemical progression of the expression of growth factors and their receptors in the prostate tumor, as well as to evaluate its correlation with classic clinic pathological markers of prostate cancer.

2. Materials and methods

2.1. Patients

All the procedures followed were examined and approved by the University of Alcalá and Principe de Asturias Hospital Ethics Committees (reference number 2013/003/20130214) and were in accordance with the ethical standards of the Committee for Human Experimentation, with the Helsinki Declaration of 1975 (revised in Tokyo 2004) and the Committee on Publication Ethics (COPE) guidelines. This study was made with the consent of the patients' relatives or their family in autopsy cases.

Prostates were obtained from: (a) histologically normal prostates (NP) obtained at autopsy (8–10 h after death) from 20 men

(aged between 20 and 38 years) without histories of reproductive, endocrine or related diseases; (b) transurethral resections from 35 men (aged between 53 and 88 years) with clinical and histopathological diagnosis of benign prostatic hyperplasia (BPH); (c) radical prostatectomies from 86 men (aged between 52 and 74 years) with prostate cancer. Prostate cancer was detected by serum PSA (prostate specific antigen) screening and rectal examination, and diagnostic was confirmed by histopathological examination of needle biopsy cores. The median age (range) at time of surgery was 66 (52–74). Patients were generally scheduled to have a serum PSA measure every 3 months for the first year and every 6 months thereafter. Median follow-up (range) time of the cohort was 75.9 (15.6–159.2) months, being defined as the time between the surgery and the endpoint of the study or the last record. Clinic pathological features of patients are shown in Table 1.

Each diagnosed sample was divided into two portions; one portion was immediately processed for immunohistochemistry, while the other portion that was frozen in liquid nitrogen and maintained at -80°C for Western Blotting analysis. In this later portion, cryostat sections were stained with toluidine blue to confirm histopathological diagnosis. All pathological, clinical or personal data were anonymized and separated from any personal identifiers. This study was made with the consent of the patients' relatives or their family in autopsy cases.

2.2. Reagents

Total serum PSA was measured by the AxSYM system (Abbott, IL). All primary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The primary antibodies used were: rabbit anti-human TNF- α , IL-1a, IL-1B, IL-1Ra, IL-1RI, EGF, EGFR, IL-6, gp-130, TGF-B, TGFBR1, TGFBR2; mouse anti-human IL-1RII; and goat anti-human TNFR1. For immunohistochemistry analysis antibodies were diluted at 1:200 (TNF- α , TGF-B), 1:150 (IL-1a, IL-1B, IL-1Ra, IL-1RI, IL-6, gp-130), 1:100 (TNFR1, TGFBR2, IL-1RII, EGFR), 1:50 (EGF, TGFBR1) in TBS. Biotin-conjugated antibodies (DAKO, Barcelona, Spain) and Vectastain ABC (avidin-biotin complex) kit (Vector Labs, Barcelona, Spain) were at a 1:500 dilution.

Table 1
Clinicopathological features of patients.

	Median (range)
Age (years)	66.00 (52–74)
Preoperative serum PSA (ng/ml)	11.35 (1.4–233)
	% (n)
Preoperative serum PSA (ng/ml)	
<10 ng/ml	36.0 (31)
≥ 10 ng/ml	64.0 (55)
Gleason score	
≤ 6	82.6 (71)
7	9.3 (8)
≥ 8	8.1 (7)
Clinical T stage	
I	54.7 (47)
II	45.3 (39)
Pathological T stage	
II	65.1 (56)
III	31.4 (27)
IV	3.5 (3)
Perineural invasion (yes)	26.7 (23)
Positive surgical margins	38.4 (33)
Node involvement (yes)	4.7 (4)
Biochemical progression (yes)	33.7 (29)
Survival (yes)	73.3 (63)

2.3. Immunohistochemical analysis and scoring

Immediately after surgery prostate tissues were fixed, dehydrated, and embedded in paraffin, and 5 μ m thick sections were processed following the avidin–biotin–peroxidase complex (ABC) method as described previously [23].

Specificity controls for immunohistochemistry were performed as previously published [24–26]. Briefly, for negative controls tissues were incubated with blocking peptides or preimmune serum (Santa Cruz Biotechnology). As external positive controls, histologic sections of human lymph nodes, skin or thymus were incubated with the same antibodies.

Immunostaining was evaluated at both cancerous epithelium and surrounding stroma level by two independent pathologists (P.M.-O. and G.O.), blinded for the endpoint, in five randomly selected fields per section and six sections per patient. First, patients were stratified as positive (those showing staining in more than 5% of the surface of the corresponding compartment) or negative. Moreover, a score combining both intensity and percentage of immunostained surface was assigned to each sample, and accordingly patients were stratified as having “negative”, “positive low” or “positive high” immunostaining.

2.4. Statistical analysis

The endpoint of the study was time to biochemical progression, defined as the time between definitive therapy to the first of at least two consecutive elevations in the total serum PSA level above 0.2 ng/ml. Established prognostic variables included in the study were preoperative serum PSA, pathological and clinical T stages (2010 AJCC/UICC TNM classification [27]), postoperative Gleason score (2005 ISUP modified [28]), lymph node involvement and surgical margins status. To evaluate the association between clinicopathological (clinical T stage, pathological T stage, preoperative serum PSA and Gleason score) and immunohistochemical variables Spearman's test was performed. Log-rank test and Kaplan–Meier analyses were used for survival comparisons. To explore the correlation of the studied immunohistochemical parameters and established prognostic variables with biochemical progression, univariate and multivariate Cox proportional hazard regression analyses were performed. All statistical analyses were performed using the SPSS 22.0 software (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). P values <0.05 were considered as significant.

3. Results

3.1. Comparative analysis of expression of the studied proteins in NP, BPH and PC

In previous manuscripts we have studied by immunohistochemistry the expression of these cytokines and their receptors in normal, BPH and prostate cancer [14,25,26,29–31]. The results obtained in previous manuscripts were similar than those reported in the present work, but with minor variations, likely due to the increased number of patients included in this study (Table 2).

In NP immunoreaction was found for TNF- α , TNFR1, EGF, EGFR, TGFBR1, IL-6, gp-130 and IL-1B, and in the cytoplasm of epithelial cells; and for TNFR1, EGFR, IL-6, gp-130, IL-1B and IL-1RI in stromal cells. No immunoreaction was found to IL-1 α , IL-1Ra, IL-1RII or TGF-B and TGFRI (Table 2).

In BPH, all the studied proteins were localized in epithelial cells, except IL-1RI, which was exclusively detected in stromal cells. Moreover, TNFR1, EGFR, TGF-B, TGFBR1, TGFBR2, IL-6, gp-130, IL-1 and IL-1RII, were also detected in stromal cells (Table 2). The percentage of patients showing positive immunoreactions for TNF- α , TNFR1, IL-1 α , IL-1Ra, IL-1RII, TGF-B, TGFRI and TGFRII was higher in BPH in comparison with NP, while for IL-6, gp-130, IL-1RI, EGF and EGFR was lower.

In PC, TNF- α , EGF, IL-1 α , IL-1RII and IL-1Ra were observed only in epithelial cells. All the other proteins were localized in both epithelial and stromal cells. When are compared the % of positive patient between BPH and Cancer the same pattern was observed except for TNF- α , gp-130, IL-1RI and EGF. When we analyzed the optical density, the increase is significant only to IL-1 family (all members), TGF-B, TGFRI, TGFRII. Try to find out if these variations between NP and pathological condition or between BPH and cancer may have some correlation with clinical patient (Table 2).

In some statistical analysis we used immunostaining score (Negative, positive-low, positive-high) (see Table 3).

3.2. Correlation between immunohistochemical variables and clinicopathological features

Some significant correlations were found between the stromal expression of the studied proteins and the clinicopathological variables (Table 4A). Thus, inverse correlations were found between EGF and both pathological stage and Gleason score, TGF-B and

Table 2

Percentages of patients showing positive immunohistochemical reactions to all the antibodies studied in normal prostate (NP), benign prostatic hyperplasia (BPH), and prostatic carcinoma (PC); and average optical densities (O.D.) of immunostainings in positive patients (epithelium and stroma).

	NP			BPH			PC		
	% (n)	Epithelium O.D.	Stroma O.D.	% (n)	Epithelium O.D.	Stroma O.D.	% (n)	Epithelium O.D.	Stroma O.D.
TNF- α	80 (16)	36.30 \pm 4.5	–	94.3 (33)	31.34 \pm 3.9	–	87.2 (75)	31.88 \pm 4.17	–
TNFR1	80 (16)	16.27 \pm 4.43	5.9 \pm 2.47	88.6 (31)	20.9 \pm 3.1	4.8 \pm 3.93	96.5 (83)	22 \pm 4.54	5.8 \pm 2.61
EGF	100 (20)	6.8 \pm 2.2 ^a	–	80 (28)	21.8 \pm 2.58 ^b	–	87.2 (75)	21.25 \pm 2.75 ^b	–
EGFR	100 (20)	13.5 \pm 2.9 ^a	4.18 \pm 1.1	57.1 (20)	25.4 \pm 2.01 ^b	3.99 \pm 2.5	97.7 (84)	27.45 \pm 2.98 ^b	3.98 \pm 2.5
TGF-B	0	–	–	37.1 (13)	19.93 \pm 2.55 ^a	5.18 \pm 3.1	81.4 (70)	34.15 \pm 2.87 ^b	5.44 \pm 3.4
TGFBR1	0	–	–	62.8 (22)	17.46 \pm 1.64 ^a	6.17 \pm 2.7	91.9 (79)	31.68 \pm 2.53 ^b	5.78 \pm 2.3
TGFBR2	40 (8)	29.77 \pm 1.8 ^a	–	68.6 (24)	41.22 \pm 3.8 ^c	5.87 \pm 2.7	95.3 (82)	36.96 \pm 2.53 ^b	5.40 \pm 1.9
IL-6	100 (20)	6.8 \pm 2.21 ^a	5.6 \pm 2.4 ^a	80 (28)	21.8 \pm 2.58 ^b	4.9 \pm 1.75 ^a	67.4 (58)	21.25 \pm 2.75 ^b	6.9 \pm 3.27 ^a
gp-130	100 (20)	13.5 \pm 2.9 ^a	1.1 \pm 0.97 ^a	57.1 (20)	25.4 \pm 2.01 ^b	17.4 \pm 4.43 ^a	91.9 (79)	27.45 \pm 2.98 ^b	23.78 \pm 5.12 ^a
IL-1 α	0	–	–	77.1 (27)	20.89 \pm 1.19 ^a	–	95.3 (82)	39.22 \pm 2.45 ^b	–
IL-1B	75 (15)	32.58 \pm 1.59 ^a	36.56 \pm 2.3 ^y	73.5 (26)	55.41 \pm 2.23 ^b	58.83 \pm 3.3 ^z	84.9 (73)	39.6 \pm 2.84 ^b	46.84 \pm 4.3 ^z
IL-1RI	100 (20)	–	8.52 \pm 1.62 ^a	79.3 (28)	–	33.01 \pm 3.34 ^b	88.4 (76)	37.88 \pm 1.71	42.69 \pm 1.8 ^c
IL-1RII	0	–	–	41.9 (15)	28.27 \pm 2.15	13.91 \pm 1.51	86 (74)	43.42 \pm 2.21 ^b	–
IL-1Ra	0	–	–	40 (14)	35.41 \pm 2.23 ^a	–	60.5 (52)	26.04 \pm 2.8 ^b	–

Average optical densities were evaluated only in patients showing positive immunoreactions. Values denoted by different superscripts are significantly different from each other. Those values sharing the same superscript are not statistically different from each other. Statistical analysis refers to each antibody separately. Significance was determined by the Fisher exact test at $p > 0.05$.

Table 3

Distribution of patients according expression and immunostaining score (positive low; positive high) for stroma and tumor immunostaining.

	Stroma				Tumor			
	Expression		Intensity		Expression		Intensity	
	Negative % (n)	Positive % (n)	Positive low % (n)	Positive high % (n)	Negative % (n)	Positive % (n)	Positive low % (n)	Positive high % (n)
TNF alfa	23.3 (20)	76.7 (66)	22.1 (19)	54.7 (47)	24.7 (21)	75.3 (65)	17.4 (15)	58.1 (50)
TNFR1	8.1 (7)	91.9 (79)	31.4 (27)	60.5 (52)	3.5 (3)	96.5 (83)	5.8 (5)	90.7 (78)
EGF	73.3 (63)	26.7 (23)	14.0 (12)	12.7 (11)	57.0 (49)	43.0 (37)	30.2 (26)	12.8 (11)
EGFR	8.1 (7)	91.9 (79)	40.7 (35)	51.2 (44)	2.3 (2)	97.7 (84)	14.0 (12)	83.7 (72)
TGF- β	48.8 (42)	51.2 (44)	29.1 (25)	22.1 (19)	52.9 (46)	47.1 (40)	29.4 (25)	17.6 (15)
TGFBRI	68.6 (59)	31.4 (27)	29.1 (25)	2.3 (2)	36.5 (31)	63.5 (54)	35.3 (30)	28.2 (24)
TGFBRII	61.6 (53)	38.4 (33)	32.6 (28)	5.8 (5)	15.3 (13)	84.7 (73)	25.9 (22)	59.3 (51)
IL-6	76.6 (66)	23.3 (20)	18.6 (16)	4.7 (4)	57.0 (49)	43.0 (37)	30.2 (26)	12.8 (11)
gp-130	37.2 (32)	62.8 (54)	33.7 (29)	29.1 (25)	14.0 (12)	86.0 (74)	14.0 (12)	72.1 (62)
IL-1 α	12.8 (11)	87.2 (75)	52.3 (45)	34.9 (30)	8.1 (7)	91.9 (79)	5.8 (5)	86.0 (74)
IL-1B	22.1 (19)	77.9 (67)	17.4 (15)	60.5 (52)	22.4 (19)	77.6 (66)	8.2 (7)	69.4 (59)
IL-1RI	14.0 (12)	86.0 (74)	24.4 (21)	61.6 (53)	17.4 (15)	82.6 (71)	25.6 (22)	57.0 (49)
IL-1RII	12.8 (11)	87.2 (75)	11.6 (10)	75.6 (65)	12.8 (11)	87.2 (75)	4.7 (4)	82.6 (71)
IL-1Ra	38.4 (33)	61.6 (53)	33.7 (29)	27.9 (24)	26.7 (23)	73.3 (63)	18.6 (16)	54.7 (47)

biochemical progression, TGF-BRII and survival, and between IL-1a and biochemical progression. On the other hand, significant positive correlations were found between the stromal expression of both TGF-BRI and IL1Ra and biochemical progression.

With regard to the tumor expression (Table 4B), significant positive correlations were found between IL-1B, IL-1RII and gp130 and clinical stage, and between IL-1Ra and biochemical progression. Conversely, significant inverse correlations were found between EGF, TGF-B and gp130 and survival, TNFR1 and positive surgical margins, and between IL-1a and biochemical progression.

3.3. Correlation between immunostaining score and clinicopathological features

In the stroma scoring intensity, significant positive correlations were found between EGF and pathological stage, and between gp-130 and node involvement, and TGFBRI and between biochemical progression (Table 5A). Further, inverse correlations were found between EGF and Gleason score, and TGF-B and biochemical progression, and TGFBRII and survival.

Table 4ACorrelation between stroma expression of immunohistochemical variables and clinicopathological features of patients. Correlations were evaluated by Spearman's test (r: correlation coefficient). Bold values highlight statistical significance ($p < 0.05$).

	Preoperative serum PSA		Pathological T stage		Clinical T stage		Gleason score	
	r	p	r	p	r	p	r	p
TNF- α	-0.069	0.526	0.048	0.661	0.114	0.294	0.180	0.096
TNFR1	0.042	0.699	0.100	0.361	0.015	0.892	0.025	0.821
EGF	-0.039	0.723	-0.228	0.035	-0.128	0.239	-0.208	0.054
EGFR	0.131	0.230	-0.040	0.714	0.015	0.892	0.034	0.758
TGF-B	-0.104	0.342	-0.072	0.510	0.002	0.984	-0.020	0.855
TGFBRI	-0.118	0.278	-0.002	0.987	0.139	0.203	-0.047	0.669
TGFBRII	-0.055	0.615	0.008	0.945	0.050	0.649	-0.051	0.641
IL-6	0.069	0.526	-0.013	0.908	0.107	0.328	0.110	0.315
gp-130	-0.177	0.103	0.124	0.255	0.121	0.266	0.100	0.358
IL-1 α	0.148	0.175	-0.002	0.988	-0.001	0.994	0.075	0.490
IL-1B	0.067	0.539	-0.064	0.560	0.147	0.176	0.015	0.888
IL-1RI	0.047	0.666	-0.112	0.304	0.097	0.373	-0.080	0.463
IL-1RII	0.075	0.492	-0.142	0.194	0.069	0.527	0.175	0.107
IL-1Ra	0.055	0.615	0.027	0.804	0.094	0.387	0.109	0.319

	Perineural Invasion		Node involvement		Positive surgical margins		Biochemical progression		Survival	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
TNF- α	0.084	0.443	-0.009	0.934	0.018	0.866	0.160	0.142	0.022	0.843
TNFR1	0.180	0.098	0.066	0.548	-0.027	0.802	0.122	0.262	-0.108	0.321
EGF	-0.009	0.935	0.116	0.287	-0.045	0.683	-0.098	0.371	0.050	0.645
EGFR	-0.204	0.059	0.066	0.548	-0.027	0.802	0.122	0.262	0.180	0.098
TGF-B	-0.040	0.712	0.105	0.334	0.101	0.354	-0.238	0.027	-0.198	0.068
TGFBRI	-0.013	0.909	-0.030	0.781	0.033	0.763	0.312	0.003	0.044	0.687
TGFBRII	0.009	0.931	0.053	0.629	0.115	0.292	0.044	0.687	-0.261	0.015
IL-6	0.040	0.711	0.140	0.199	-0.095	0.385	0.015	0.892	-0.022	0.843
gp-130	0.024	0.826	0.170	0.118	-0.085	0.436	-0.062	0.574	-0.187	0.085
IL-1 α	-0.083	0.446	0.085	0.439	0.016	0.885	-0.242	0.025	-0.083	0.446
IL-1B	-0.058	0.595	-0.015	0.888	-0.156	0.151	-0.035	0.748	-0.058	0.595
IL-1RI	-0.136	0.213	0.089	0.415	-0.096	0.378	0.003	0.976	0.016	0.885
IL-1RII	-0.083	0.446	0.085	0.439	-0.056	0.610	-0.021	0.845	-0.005	0.965
IL-1Ra	0.045	0.683	0.174	0.109	0.082	0.454	0.259	0.016	0.153	0.161

Table 4B

Correlation between tumor expression of immunohistochemical variables and clinicopathological features of patients. Correlations were evaluated by Spearman's test (r: correlation coefficient). Bold values highlight statistical significance (p < 0.05).

	Preoperative serum PSA		Pathological T stage		Clinical T stage		Gleason score	
	r	p	r	p	r	p	r	p
TNF- α	-0.032	0.769	0.121	0.266	0.137	0.208	0.119	0.277
TNFR1	-0.143	0.190	-0.163	0.135	-0.081	0.456	0.087	0.424
EGF	0.016	0.880	-0.159	0.143	0.010	0.924	-0.028	0.798
EGFR	0.045	0.682	0.112	0.305	-0.014	0.895	0.071	0.518
TGF-B	0.117	0.282	-0.005	0.967	0.181	0.096	-0.001	0.990
TGFBRI	-0.066	0.547	0.066	0.551	0.109	0.320	0.030	0.784
TGFBRII	0.021	0.846	0.111	0.310	0.058	0.593	0.024	0.827
IL-6	-0.081	0.457	-0.112	0.305	0.010	0.924	0.023	0.834
gp-130	0.047	0.666	0.158	0.148	0.299	0.005	0.008	0.940
IL-1 α	-0.046	0.672	-0.040	0.714	0.186	0.087	0.014	0.896
IL-1B	-0.055	0.620	-0.136	0.213	0.267	0.013	-0.062	0.570
IL-1RI	0.102	0.352	-0.036	0.745	0.172	0.112	-0.031	0.777
IL-1RII	0.075	0.492	-0.072	0.512	0.279	0.009	0.091	0.403
IL-1Ra	0.039	0.723	0.156	0.152	0.181	0.095	0.138	0.206

	Perineural Invasion		Node involvement		Positive surgical margins		Biochemical progression		Survival	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
TNF- α	0.099	0.365	-0.003	0.978	0.059	0.590	0.176	0.104	-0.023	0.830
TNFR1	0.115	0.292	0.042	0.701	-0.241	0.025	0.136	0.213	-0.028	0.796
EGF	0.112	0.306	0.031	0.776	-0.058	0.597	-0.123	0.259	-0.260	0.016
EGFR	-0.081	0.458	0.034	0.755	-0.037	0.736	0.110	0.313	0.093	0.393
TGF-B	-0.089	0.413	0.126	0.247	-0.065	0.554	-0.024	0.826	-0.247	0.022
TGFBRI	-0.034	0.760	-0.062	0.570	-0.048	0.660	0.184	0.091	-0.089	0.420
TGFBRII	-0.038	0.726	-0.061	0.577	0.066	0.546	0.026	0.810	-0.038	0.726
IL-6	-0.154	0.158	-0.080	0.462	-0.010	0.930	-0.024	0.829	-0.048	0.664
gp-130	-0.136	0.213	0.089	0.415	0.042	0.703	0.074	0.497	-0.212	0.051
IL-1 α	-0.204	0.059	0.066	0.548	0.027	0.802	-0.237	0.028	-0.108	0.321
IL-1B	-0.182	0.096	-0.014	0.898	-0.166	0.129	-0.090	0.411	-0.070	0.526
IL-1RI	0.001	0.994	-0.044	0.688	0.015	0.888	0.004	0.973	0.070	0.522
IL-1RII	-0.083	0.446	0.085	0.439	-0.127	0.243	-0.021	0.845	0.074	0.498
IL-1Ra	0.068	0.532	0.133	0.221	0.099	0.366	0.320	0.003	0.128	0.241

Table 5A

Correlation between stroma immunohistochemical score and clinicopathological features in stroma. Correlations were evaluated by Spearman's test (r: correlation coefficient). Bold values highlight statistical significance (p < 0.05).

	Preoperative serum PSA		Pathological T stage		Clinical T stage		Gleason score	
	r	p	r	p	r	p	r	p
TNF- α	-0.028	0.801	0.009	0.838	-0.003	0.977	0.148	0.174
TNFR1	-0.002	0.984	0.003	0.978	-0.065	0.554	-0.055	0.615
EGF	-0.034	0.756	0.238	0.028	-0.138	0.204	-0.215	0.047
EGFR	-0.015	0.889	0.122	0.264	0.089	0.415	0.079	0.471
TGF-B	-0.126	0.248	-0.087	0.428	-0.012	0.911	0.064	0.556
TGFBRI	-0.120	0.273	0.008	0.940	0.136	0.211	-0.032	0.769
TGFBRII	-0.055	0.617	0.024	0.829	0.078	0.478	-0.041	0.707
IL-6	0.072	0.512	-0.018	0.872	0.104	0.343	0.109	0.318
gp-130	-0.027	0.802	0.178	0.102	0.094	0.387	0.157	0.150
IL-1 α	0.054	0.621	-0.073	0.505	0.054	0.620	0.075	0.495
IL-1B	0.050	0.650	-0.119	0.277	0.171	0.115	0.004	0.969
IL-1RI	0.142	0.192	-0.087	0.423	0.145	0.182	-0.087	0.426
IL-1RII	0.132	0.224	-0.046	0.675	0.131	0.228	0.074	0.499
IL-1Ra	0.053	0.625	0.000	0.998	0.091	0.407	0.065	0.552

	Perineural Invasion		Node involvement		Positive surgical margins		Biochemical progression		Survival	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
TNF- α	0.048	0.664	0.063	0.565	0.027	0.803	0.101	0.357	-0.014	0.898
TNFR1	0.043	0.691	0.073	0.502	-0.092	0.400	0.002	0.983	-0.116	0.289
EGF	-0.009	0.935	0.116	0.287	-0.042	0.704	-0.109	0.317	0.029	0.794
EGFR	-0.042	0.701	0.111	0.310	-0.045	0.683	0.083	0.449	0.057	0.599
TGF-B	-0.006	0.954	0.083	0.446	0.090	0.407	-0.208	0.055	-0.198	0.068
TGFBRI	-0.004	0.971	-0.033	0.763	0.052	0.635	0.326	0.002	0.069	0.529
TGFBRII	0.002	0.986	0.082	0.453	0.108	0.322	0.028	0.799	-0.269	0.012
IL-6	0.052	0.636	0.157	0.148	-0.097	0.375	0.023	0.834	-0.022	0.844
gp-130	-0.006	0.959	0.225	0.038	-0.042	0.698	-0.051	0.641	-0.169	0.119
IL-1 α	-0.036	0.743	0.184	0.090	-0.014	0.899	-0.147	0.176	-0.036	0.743
IL-1B	-0.096	0.378	-0.041	0.710	-0.160	0.141	-0.146	0.181	-0.096	0.378
IL-1RI	-0.089	0.414	0.170	0.118	-0.081	0.460	0.006	0.954	-0.049	0.655
IL-1RII	-0.036	0.743	0.013	0.903	-0.008	0.944	0.000	1.00	-0.074	0.499
IL-1Ra	0.016	0.881	0.105	0.335	0.020	0.855	0.165	0.129	0.056	0.607

Table 5B

Correlation between tumor immunohistochemical score and clinicopathological features in tumor. Correlations were evaluated by Spearman's test (r: correlation coefficient). Bold values highlight statistical significance (p < 0.05).

	Preoperative serum PSA		Pathological T stage		Clinical T stage		Gleason score	
	r	p	r	p	r	p	r	p
TNF- α	0.025	0.817	0.031	0.780	0.060	0.586	0.054	0.619
TNFR1	0.081	0.457	0.032	0.773	-0.034	0.759	0.147	0.177
EGF	0.034	0.759	-0.153	0.158	-0.050	0.648	0.004	0.970
EGFR	-0.064	0.559	0.073	0.505	0.206	0.058	0.121	0.266
TGF-B	0.145	0.184	0.008	0.938	0.147	0.178	-0.043	0.694
TGFBRI	-0.078	0.479	0.098	0.537	0.207	0.057	0.083	0.451
TGFBRII	-0.100	0.360	0.068	0.533	0.090	0.410	0.063	0.563
IL-6	-0.090	0.411	-0.114	0.298	0.009	0.934	-0.047	0.665
gp-130	-0.112	0.307	0.047	0.665	0.280	0.009	0.129	0.238
IL-1 α	0.038	0.728	-0.006	0.957	0.171	0.115	0.091	0.403
IL-1B	0.006	0.955	-0.071	0.520	0.267	0.014	-0.034	0.756
IL-1RI	0.058	0.595	-0.062	0.571	0.234	0.030	-0.037	0.737
IL-1RII	0.211	0.051	0.012	0.916	0.246	0.022	-0.014	0.898
IL-1Ra	0.047	0.667	0.050	0.168	0.125	0.250	0.045	0.679

	Perineural Invasion		Node involvement		Positive surgical margins		Biochemical progression		Survival	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	P
TNF- α	0.098	0.369	0.054	0.621	-0.021	0.846	0.140	0.199	-0.100	0.358
TNFR1	0.106	0.331	0.071	0.518	-0.088	0.421	0.228	0.035	0.098	0.371
EGF	0.096	0.382	0.049	0.655	-0.073	0.502	-0.119	0.277	-0.262	0.015
EGFR	-0.023	0.833	0.097	0.373	-0.168	0.121	0.119	0.275	-0.150	0.167
TGF-B	-0.118	0.281	0.164	0.132	-0.067	0.539	0.002	0.988	-0.172	0.113
TGFBRI	-0.006	0.958	0.017	0.878	-0.068	0.536	0.286	0.008	-0.072	0.514
TGFBRII	-0.039	0.720	-0.052	0.635	-0.044	0.688	-0.001	0.996	-0.083	0.447
IL-6	-0.128	0.239	-0.045	0.680	-0.033	0.766	-0.014	0.898	-0.017	0.879
gp-130	-0.058	0.597	0.136	0.213	0.018	0.867	0.113	0.299	-0.124	0.257
IL-1 α	-0.216	0.045	0.089	0.417	0.035	0.748	-0.218	0.044	-0.206	0.057
IL-1B	-0.136	0.214	0.017	0.879	-0.135	0.219	-0.030	0.785	-0.076	0.490
IL-1RI	-0.089	0.418	0.050	0.648	0.003	0.980	0.099	0.364	-0.109	0.319
IL-1RII	-0.132	0.224	0.101	0.354	-0.142	0.191	0.056	0.606	0.012	0.912
IL-1Ra	-0.032	0.772	0.115	0.292	0.071	0.518	0.233	0.031	0.065	0.551

In the tumor immunostain intensity, significant positive correlations were found between EGFR, TGFBRI, gp-130, IL-1B, IL-1RI and IL-1RII and clinical stage, and between TNFR1, TGFBRI and IL-1Ra and biochemical progression and between IL-1RI and PSA (Table 5B). Additionally, significant inverse correlations were found between IL-1 α and both perineural invasion, biochemical progression and survival, and between EGF and survival.

3.4. Correlation of immunohistochemical variables with time to biochemical progression

We used the Kaplan–Meier method combined with the log-rank test to evaluate the correlation between the expression of these ligands and their receptors and time to biochemical progression.

In case of expression: biochemical progression of TGF-B negative stromal patients is shorter than positive TGF-B patients. Biochemical progression of TGFBRI positive stromal patients is many times shorter than positive TGFBRI patients. When are negative both IL-1 α expression in the tumor (epithelial compartment) or stroma the biochemical progression are shorter than positive IL-1 α patients. Positive patients to IL-1Ra in the tumor (epithelial compartment) or stroma have shorter time to biochemical progression (Fig. 1).

In case of immunostain intensity: TGFBRI positive patients have tumor high in much shorter times than low and negative-positive patient's biochemical progression. TGFBRI low stroma positive patients have progression times longer than high positive but shorter than patients with negative results. Results Patients with low positive IL-1Ra in tumor stroma and have time to biochemical progression shorter than the high positive and negative. Negative

patients in tumor IL-1Ra have very short biochemical progression with respect to high and low positive (Fig. 2).

Univariate Cox proportional hazard regression analysis was carried out to assess the prognostic value of the studied immunohistochemical markers alone.

In stroma expression of TGF-B, TGFBRI, IL-1 α and IL-1Ra are correlated with biochemical recurrence free time. While in tumor IL-1 α and IL-1Ra are correlated with biochemical recurrence free time (Table 6A).

In stroma intensity of TGFBRI is a prognostic factor for biochemical progression. In tumor intensity of TGFBRI and IL-1 α are prognostic factors for biochemical progression (Table 6B).

The results shown in Tables 5 and 6 can be summarized in Table 7.

Preoperative serum PSA, Pathological stage, Gleason score, lymph node involvement and surgical margins status are commonly used prognostic markers for biochemical recurrence after radical prostatectomy [32]. In the present series, Gleason score, Pathological T stage and lymph node involvement (Tables 8A and 8B), but not preoperative serum PSA, perineural invasion or surgical margin status, correlated with the endpoint as evidenced both Kaplan–Meier and univariate Cox analyses.

Subsequently entered into the multivariate regression models of Cox proportional hazards to explore the prognostic value of immunohistochemical markers studied in combination with classic variables used. As prognostic variables (pathological T stage, Gleason score and lymph node) and immunohistochemical parameters (TGF-B, IL-1 α , intensity TGFBRI and intensity TGFBRII) may be significant in the univariate analysis. Among the parameters studied.

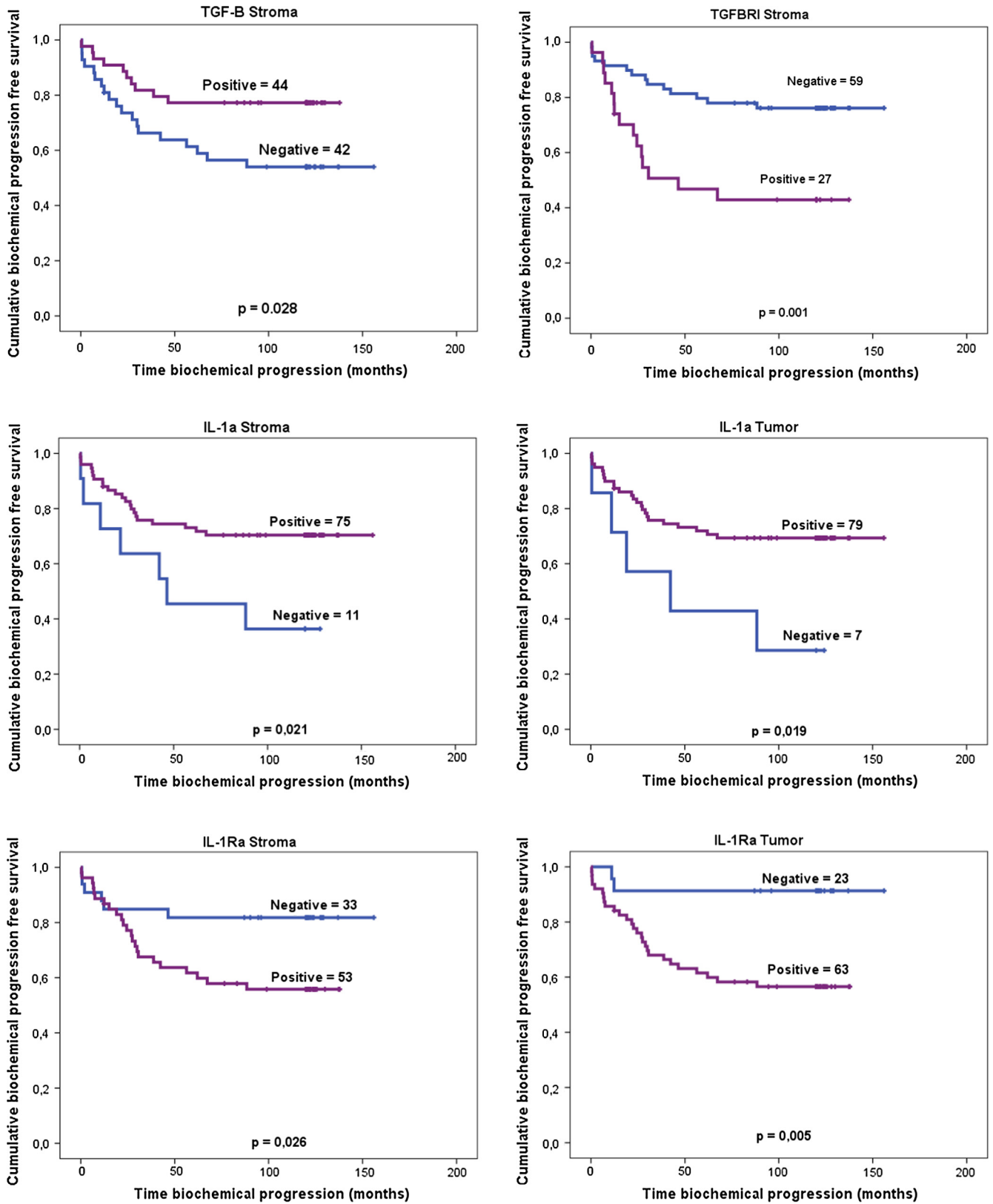


Fig. 1. Significant Kaplan-Meier analyses of immunochemical expression markers for time to biochemical progression. Vertical tick marks represent censored observations. Statistical significance was evaluated by log-rank test (p values).

The expression in the stroma of TGF-B, TGFBRI, and IL-1a were significant with pathological stage, Gleason score and node involvement. For the tumor he was also significant IL-1a. IL-1Ra is only significant with pathological stage and Gleason score (Table 8A).

TGFBRI intensity in the stroma and IL-1a in the tumor obtained significant results to adjust with the pathologic stage, Gleason score and node involvement. Furthermore, TGFBRI is significant for tumor pathological stage and Gleason score in tumor intensity (Table 8B).

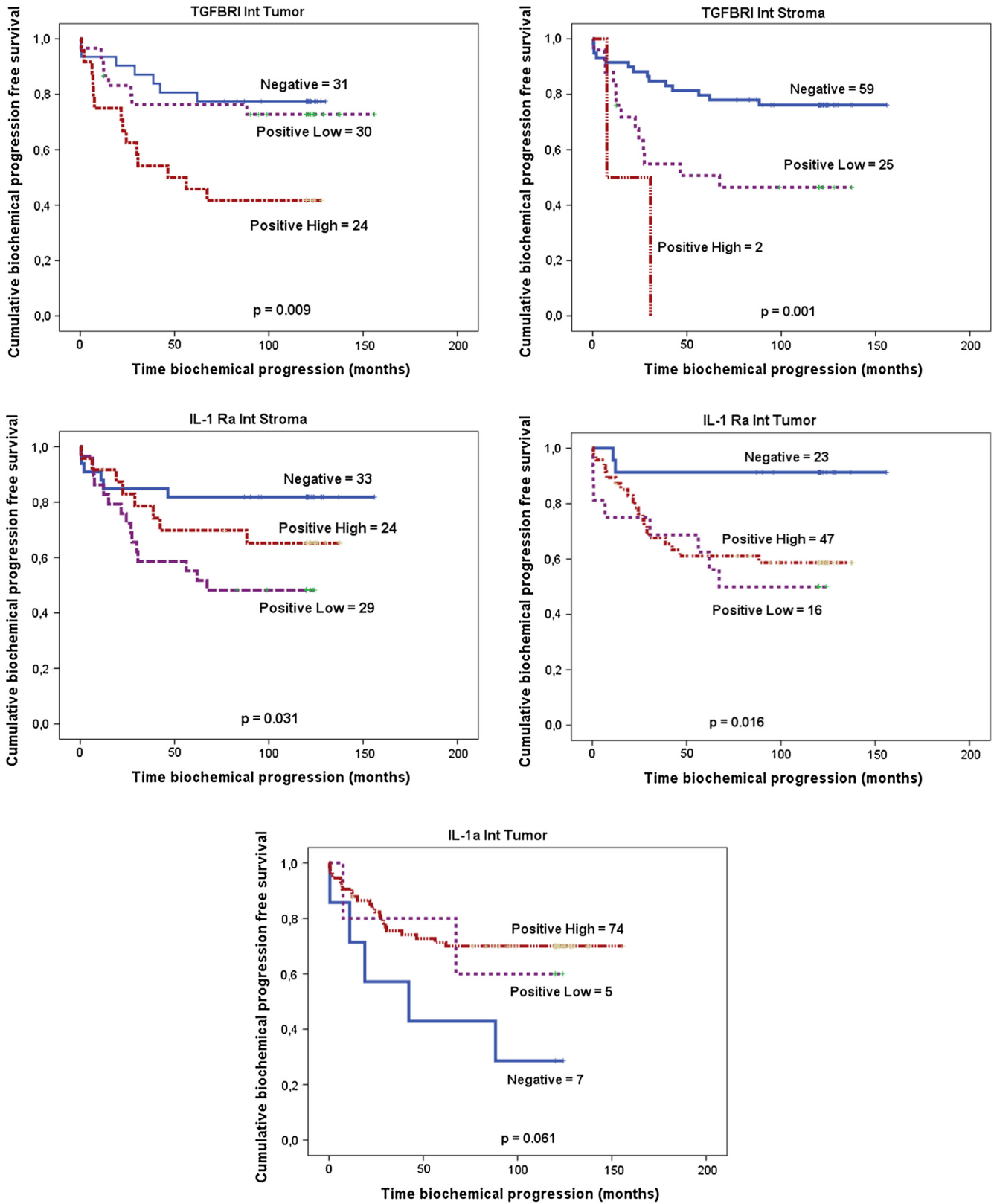


Fig. 2. Significant Kaplan-Meier analyses of immunohistochemical score markers for time to biochemical progression. Vertical tick marks represent censored observations. Statistical significance was evaluated by log-rank test (p values).

4. Discussion

Research in prostate cancer has focused on finding new prognostic markers which, along with the established ones (e.g. serum

PSA levels, Gleason score and disease stage) improve the prediction accuracy. Different risk factors might be involved in prostate cancer, as pro-inflammatory (TNF- α , IL-1 and IL-6) or anti-inflammatory (EGF, TGF-B) cytokines. All of them activate different

Table 6A

Univariate Cox proportional hazard regression analysis for biochemical progression according to either immunohistochemical expression in stroma and glands.

Stroma	p value	Hazard ratio (95% CI)	Tumor	p value	Hazard ratio (95% CI)
TNF- α	0.230	1.909 (0.664–5.486)	TNF- α	0.159	2.140 (0.742–6.169)
TNFRI	0.289	2.943 (0.400–21.63)	TNFRI	0.452	21.47 (0.007–63,831)
EGF	0.364	0.660 (0.260–1.621)	EGF	0.262	0.645 (0.300–1.387)
EGFR	0.274	3.043 (0.414–22.37)	EGFR	0.219	2.00 (0.662–6.036)
TGF-B	0.033	0.434 (0.202–0.934)	TGF-B	0.825	0.921 (0.443–1.914)
TGFBRI	0.002	3.114 (1.496–6.483)	TGFBRI	0.092	2.080 (0.888–4.873)
TGFBRII	0.794	1.104 (0.527–2.312)	TGFBRII	0.698	1.232 (0.429–3.542)
IL-6	0.835	1.095 (0.467–2.563)	IL-6	0.661	0.847 (0.405–1.775)
gp-130	0.553	0.800 (0.382–1.675)	gp-130	0.438	1.605 (0.486–5.304)
IL-1a	0.024	0.380 (0.162–0.891)	IL-1a	0.026	0.334 (0.127–0.877)
IL-1B	0.973	0.985 (0.421–2.307)	IL-1B	0.581	0.795 (0.352–1.795)
IL-1RI	0.810	0.879 (0.305–2.529)	IL-1RI	0.873	0.924 (0.352–2.424)
IL-1RII	0.960	0.973 (0.339–2.797)	IL-1RII	0.959	1.028 (0.358–2.954)
IL-1Ra	0.033	2.668 (1.085–6.562)	IL-1Ra	0.014	6.025 (1.431–25.36)

Abbreviation: CI = confidence interval. Bold values indicate significant correlations.

Table 6B

Univariate Cox proportional hazard regression analysis for biochemical progression according to either immunostaining score in stroma and gland.

Stroma	p value	Hazard ratio (95% CI)	Tumor	p value	Hazard ratio (95% CI)
TNF- α	0.290	1.289 (0.805–2.065)	TNF- α	0.197	1.368 (0.850–2.201)
TNFRI	0.913	1.031 (0.592–1.799)	TNFRI	0.211	24.29 (1.164–3591)
EGF	0.255	0.706 (0.388–1.285)	EGF	0.309	0.748 (0.427–1.309)
EGFR	0.365	1.313 (0.728–2.368)	EGFR	0.219	2.000 (0.662–6.036)
TGF-B	0.079	0.630 (0.377–1.054)	TGF-B	0.919	1.025 (0.636–1.652)
TGFBRI	0.001	2.844 (1.564–5.172)	TGFBRI	0.008	1.905 (1.185–3.064)
TGFBRII	0.955	0.983 (0.542–1.784)	TGFBRII	0.887	1.036 (0.637–1.685)
IL-6	0.633	1.916 (0.613–2.238)	IL-6	0.738	0.916 (0.547–1.534)
gp-130	0.585	0.882 (0.562–1.384)	gp-130	0.257	1.397 (0.783–2.491)
IL-1a	0.137	0.653 (0.372–1.146)	IL-1a	0.030	0.585 (0.361–0.949)
IL-1B	0.436	0.848 (0.561–1.283)	IL-1B	0.803	0.938 (0.566–1.553)
IL-1RI	0.803	0.938 (0.556–1.553)	IL-1RI	0.492	1.198 (0.716–2.006)
IL-1RII	0.958	1.014 (0.606–1.697)	IL-1RII	0.634	1.145 (0.655–2.003)
IL-1Ra	0.197	1.337 (0.860–2.077)	IL-1Ra	0.073	1.366 (0.970–2.018)

Abbreviation: CI = confidence interval. Bold values indicate significant correlations.

Table 7

Biochemical progression and univariate Cox proportional hazard regression analysis for biochemical progression according to Immunohistochemical expression and immunostaining score in stroma and gland. These cytokines only are correlated with biochemical recurrence free time.

Stroma	Biochemical progression		p value	Hazard ratio (95% CI)
	r	p		
<i>Immunohistochemical expression</i>				
TGF-B	-0.238	0.027	0.033	0.434 (0.202–0.934)
TGFBRI	0.312	0.003	0.002	3.114 (1.496–6.483)
IL-1a	-0.242	0.025	0.024	0.380 (0.162–0.891)
IL-1Ra	0.259	0.016	0.033	2.668 (1.085–6.562)
<i>Immunostaining score</i>				
TGFBRI	0.326	0.002	0.001	2.844 (1.564–5.172)
IL-1a	-0.147	0.176	0.137	0.653 (0.372–1.146)
IL-1Ra	0.165	0.129	0.197	1.337 (0.860–2.077)
Tumor	Biochemical progression		p value	Hazard ratio (95% CI)
	r	p		
<i>Immunohistochemical expression</i>				
TGF-B	-0.024	0.826	0.825	0.921 (0.443–1.914)
TGFBRI	0.184	0.091	0.092	2.080 (0.888–4.873)
IL-1a	-0.237	0.028	0.026	0.334 (0.127–0.877)
IL-1Ra	0.320	0.003	0.014	6.025 (1.431–25.36)
<i>Immunostaining score</i>				
TGFBRI	0.286	0.008	0.008	1.905 (1.185–3.064)
IL-1a	0.218	0.044	0.030	0.585 (0.361–0.949)
IL-1Ra	0.233	0.031	0.073	1.366 (0.970–2.018)

Table 8A

Multivariate Cox proportional hazard regression analysis for biochemical progression for stroma and tumor immunohistochemical expression.

	p value	Hazard ratio (95% CI)
<i>A</i>		
Pathological T stage	0.008	2.176 (1.224–3.867)
Gleason score	0.005	3.456 (1.442–8.282)
Node involvement	0.022	3.796 (1.211–11.898)
TGFB stroma	0.019	0.399 (0.185–0.861)
<i>B</i>		
Pathological T stage	0.045	1.875 (1.015–3.464)
Gleason score	0.001	4.068 (1.751–9.449)
Node involvement	0.042	3.472 (1.047–11.519)
TGFRI stroma	0.002	3.432 (1.596–7.380)
<i>C</i>		
Pathological T stage	0.014	2.113 (1.166–3.827)
Gleason score	0.002	3.798 (1.639–8.801)
Node involvement	0.008	4.737 (1.500–14.956)
IL-1a stroma	0.003	0.265 (0.109–0.644)
<i>D</i>		
Pathological T stage	0.020	2.026 (1.118–3.669)
Gleason score	0.004	3.447 (1.502–7.913)
Node involvement	0.010	4.533 (1.444–14.233)
IL-1a tumor	0.010	0.272 (0.101–0.734)
<i>E</i>		
Pathological T stage	0.006	2.339 (1.270–4.308)
Gleason score	0.005	3.203 (1.423–7.211)
IL-1Ra stroma	0.055	2.435 (0.981–6.048)
<i>F</i>		
Pathological T stage	0.011	2.281 (1.204–4.322)
Gleason score	0.007	3.084 (1.368–6.953)
IL-1Ra tumor	0.029	4.978 (1.175–21.098)

Abbreviation: HR, hazard ratio; CI, confidence interval. Bold values indicate significant correlations.

but interrelated transduction pathways and at the same time, by sequential activation of their downstream components provoke activation of several transcription factors. When we correlate

Table 8B
Multivariate Cox proportional hazard regression analysis for biochemical progression for stroma and tumor immunostaining score.

	p value	Hazard ratio (95% CI)
A		
Pathological T stage	0.044	1.856 (1.016–3.390)
Gleason score	0.005	3.334 (1.434–7.754)
Node involvement	0.023	3.952 (1.211–12.898)
TGFBR1 Int. Stroma	0.001	2.559 (1.444–4.535)
B		
Pathological T stage	0.011	2.130 (1.186–3.827)
Gleason score	0.004	3.263 (1.444–7.375)
TGFBR1 Int. Tumor	0.018	1.806 (1.105–2.953)
C		
Pathological T stage	0.016	2.063 (1.145–3.719)
Gleason score	0.002	3.639 (1.580–8.380)
Node involvement	0.008	4.718 (1.495–14.887)
IL-1a Int. Tumor	0.005	0.499 (0.305–0.815)

Abbreviation: HR, hazard ratio; CI, confidence interval. Bold values indicate significant correlations.

the results of immunohistochemistry with the patient's clinical history, our objective was to determine if all the observed variations for the same antibody among the different study groups could be correspond to the clinic pathological factors.

We have previously reported the immunoeexpression of TNF- α and its receptors (TNFR1 and TNFR2) in the cytoplasm of epithelial cells in normal and prostatic disease (BPH, PIN) [3]. In addition, the expression and action of TNF- α and its receptors have been reported in several tumors as esophageal [2], follicular thyroid [4], breast [5], gastric [33] or liver [34] cancers. The presence of mRNA TNF- α and TNFR1 in prostate cancer cell lines indicated that those are produced in the tissue where they will carry out [35]. Elevated levels of TNF- α were correlated with increased risk of mortality associated with increased malignancy [36]. The increase of the cytokine with its receptor, can promote proliferation and elevated apoptosis [36]. A loss of control of cell growth and mutations favors uncontrolled proliferation and apoptosis [36]. In the current study we didn't find significant changes in optical density between groups. However, we have observed an increase in the number of patients with cancer that express TNF- α and TNFR. In addition, an increased level of TNFR1 in prostate cancer was correlated with increased preoperative serum PSA [1,11]. In our study also observed the same results but also TNFR1 was correlated with Pathological T stage. In other manuscript TNF- α also has been correlated with extent of disease [36], poor prognosis and resistance to therapy [11].

IL-6 promotes the signaling pathways that end with the activation of transcription factors associated with cell survival and proliferation [37–39]. Our group also described the presence of IL-6 and gp-130 in normal and prostatic disease [14]. *In vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that both IL-6 and its receptors are expressed in PC. Moreover, it has been reported that elevated serum levels of IL-6 were associated with metastases and the progression to hormone refractory disease [40], suggesting that may be a good candidate for the development of targeted therapies in PC. In our study we show that the optical density for IL-6 and gp-130 is higher in patients who developed either (BPH or cancer) but no differences were found between both pathologies. However, the number of patients that express IL-6 or gp-130 decreases with malignance. When we correlated our immunohistochemical variables with clinicopathological features we observed that IL-6 was correlated with survival whereas gp-130 was correlated with pathological T stage or positive surgical margins.

IL-1 family is related to inflammatory processes. Analysis of IL-1 family results showed a very homogeneous distribution with regard to prostate pathologies [25,41]. IL-1a, IL-1Ra or IL-1RII

expression has not been observed in patients without prostate disease. Other studies have shown that all these proteins are detected in BPH and PC [25,41] and are related with tumor invasiveness and metastasis [42]. We are found that IL-1a showed a negative correlation with biochemical progression. Moreover IL-1B is related to clinical T stage and IL-1RI was inversely correlated with Gleason score, whereas IL-1RII was inversely correlated with positive surgical margins. IL-1a deficient mice, a delay in tumor growth and an impaired angiogenic response were observed. Voronov et al. [42] described neutralization of the IL-1 family as possible anti-cancer therapy.

Previously, other authors described an increase expression of TGF- β and its receptors in prostate cancer compared to patients without pathology [29] or adjacent tissues. Shariat et al. [43] related loss of TGFBR1 expression as a prognostic marker in patients with prostate cancer. Reis et al. [44] relate increased expression of TGF- β 1 with higher Gleason scores, which along with the results strongly suggests that TGF- β 1 expression may be a useful prognostic marker for prostate cancer. Although we have not observed significant correlations with Gleason score, we suggest that TGF- β could be a determining factor in progression and prognosis of prostate cancer since was inversely correlated with perineural invasion, biochemical progression and survival.

The expression of EGF and EGFR has been extensively studied. Different authors have described greater expression in pathological samples compared to non-pathological samples [30]. EGFR expression was high in PC, possibly as a consequence of mutations that can occur in said receptor [38]. When we analyzed immunohistochemical and clinicopathological features we obtained significant correlations only with biochemical progression and EGFR. Previous studies support similar results when described that EGFR contributes to the progression of PC [45].

The aim of our study was to determine which of the antibodies used would help us to measure the biochemical progression of patients. Therefore, after analyzing each of these antibodies with different clinical characteristics of patients now analyzed by univariate Cox risk proportion with biochemical progression. Two analyzes were made, one by analyzing positive and negative patients; and other, analyzing the intensity of immunohistochemistry. Only TGF- β ($p \leq 0.032$) and IL-1a ($p \leq 0.001$) were significant. With intensity were significant TGFBR1 receptors. In order to relate these four antibodies (TGF- β , IL-1a, TGFBR1 and TGFBR2) with classical markers with significant results (pathological T stage, Gleason score and node involvement) a multivariate Cox proportional hazard regression was performed. The end result was that only IL1a alone has been related with biochemical progression. In other previous manuscripts [37] we suggested that prostatic expression of TNF- α and IL-1B predicts clinical outcome in prostate cancer, which supports the involvement of the signaling pathways triggered by these cytokines in prostate cancer progression. In this analysis and with these patients, we have observed no significant associations between IL-1B or TNF- α and biochemical progression. Dluzniewski et al. [46] in prostate cancer also has been reported that variation in the IL-1B gene was associated with prostate cancer recurrence independent of pathological prognostic factors. In a recent paper, where LNCaP was used IL-1a, has been described as a promoter of angiogenesis and prostate cancer growth. In other cancers as liver, colon, pancreatic or gastric IL-1a also has been reported to be involved in cell proliferation, angiogenesis and metastasis [47]. There is evidence that treatment with IL-1 would affect the ability of the immune system [48,49]. As Interleukin-1 is able to induce myeloid suppressor cells, its neutralization may be beneficial if used in combination with other agents [49].

5. Conclusions

In summary, our results suggest a role for prostatic expression of TGF- β , IL-1 α , TGFBR1 and TGFBR2 as prognostic markers for prostate cancer. The rational combination of novel agents directed towards the inactivation of TGF- β , IL-1 α , TGFBR1 and TGFBR2 could disrupt complementary tumor cell proliferation pathways.

Competing interests

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

Supported by grants from the “Instituto de Salud Carlos III” (PI13/01801) of Spain.

References

- [1] Y. Bouraoui, M. Ricote, I. García-Tuñón, G. Rodríguez-Berriguete, M. Touffehi, N.B. Rais, B. Fraile, R. Paniagua, R. Oueslati, M. Royuela, Pro-inflammatory cytokines and prostate-specific antigen in hyperplasia and human prostate cancer, *Cancer Detect. Prev.* 32 (1) (2008) 23–32.
- [2] K. Hubel, G. Mansmann, H. Schafer, F. Oberhauser, V. Diehl, A. Engert, Increase of anti-inflammatory cytokines in patients with esophageal cancer after perioperative treatment with G-CSF, *Cytokine* 12 (2000) 1797–1800.
- [3] M.P. De Miguel, M. Royuela, F.R. Bethencourt, L. Santamaría, B. Fraile, R. Paniagua, Immuno-expression of tumour necrosis factor- α and its receptors 1 and 2 correlates with proliferation/apoptosis equilibrium in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate, *Cytokine* 5 (2000) 535–538.
- [4] B. Zubelewicz, M. Muc-Wierzgon, J. Wierzgon, et al., Genetic deregulation of gene coding tumor necrosis factor α receptors (TNF α Rs) in follicular thyroid cancer—preliminary report, *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 16 (2002) 98–104.
- [5] I. García-Tuñón, M. Ricote, A. Ruiz, B. Fraile, R. Paniagua, M. Royuela, Role of tumor necrosis factor- α and its receptors in human benign breast lesions and tumors (in situ and infiltrative), *Cancer Sci.* 97 (2006) 1044–1049.
- [6] D.M. Elaraj, D.M. Weinreich, S. Varghese, et al., The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 1088–1096.
- [7] T. Sakurai, G. He, A. Matsuzawa, et al., Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 α release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis, *Cancer Cell* 14 (2008) 156–165.
- [8] G. Lurje, A.E. Hendifar, A.M. Schultheis, et al., Polymorphisms in interleukin 1 B and interleukin 1 receptor antagonist associated with tumor recurrence in stage II colon cancer, *Pharmacogenet. Genomics* 19 (2009) 95–102.
- [9] C. Kiyohara, T. Horiuchi, K. Takayama, Y. Nakanishi, IL1B rs1143634 polymorphism, cigarette smoking, alcohol use, and lung cancer risk in a Japanese population, *J. Thorac. Oncol.* 5 (2010) 299–304.
- [10] H. Xue, B. Lin, P. Ni, H. Xu, G. Huang, Interleukin-1B and interleukin-1 RN polymorphisms and gastric carcinoma risk: a meta-analysis, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25 (2010) 1604–1617.
- [11] G. Rodríguez-Berriguete, B. Sánchez-Espiridión, J.R. Cansino, et al., Clinical significance of both tumor and stromal expression of components of the IL-1 and TNF- α signaling pathways in prostate cancer, *Cytokine* 64 (2013) 555–563.
- [12] P.C. Heinrich, I. Behrmann, G. Müller-Newen, F. Schaper, L. Graeve, Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp-130/Jak/STAT pathway, *Biochem. J.* 334 (1998) 297–314.
- [13] S.L. Valles, M. Benlloch, M.L. Rodríguez, et al., Stress hormones promote growth of B16-F10 melanoma metastases: an interleukin 6- and glutathione-dependent mechanism, *J. Trans. Med.* 11 (2013) 72.
- [14] M. Royuela, M. Ricote, M.S. Parsons, I. García-Tuñón, R. Paniagua, M.P. de Miguel, Immunohistochemical analysis of the IL-6 family of cytokines and their receptors in benign, hyperplastic, and malignant human prostate, *J. Pathol.* 202 (2004) 41–49.
- [15] K. Tawara, J.T. Oxford, C.L. Jorczyk, Clinical significance of interleukin (IL)-6 in cancer metastasis to bone: potential of anti-IL-6 therapies, *Cancer Manage. Res.* 3 (2011) 177–189.
- [16] H. Ujiiie, M. Tomida, H. Akiyama, et al., Serum hepatocyte growth factor and interleukin-6 are effective prognostic markers for non-small cell lung cancer, *Anticancer Res.* 32 (2012) 3251–3258.
- [17] N.E. Hynes, H.A. Lane, ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors, *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 341–354.
- [18] N.N. Zheleznova, P.D. Wilson, A. Staruschenko, Epidermal growth factor-mediated proliferation and sodium transport in normal and PKD epithelial cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1812 (2011) 1301–1313.
- [19] R. Bianco, T. Gelardi, V. Damiano, F. Ciardiello, G. Tortora, Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 1416–1431.
- [20] J. Massagué, TGF β in cancer, *Cell* 134 (2008) 215–230.
- [21] S. Salm, P.E. Burger, E.L. Wilson, TGF- β and stem cell factor regulate cell proliferation in the proximal stem cell niche, *Prostate* 72 (2012) 998–1005.
- [22] S. Thalita dos Reis, J. Pontes-Júnior, A.A. Antunes, et al., Tgf- β 1 expression as a biomarker of poor prognosis in prostate cancer, *Clinics (Sao Paulo)* 66 (2011) 1143–1147.
- [23] M. Ricote, I. García-Tuñón, F. Bethencourt, et al., The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia, *J. Pathol.* 208 (2006) 401–407.
- [24] M. Ricote, M. Royuela, I. García-Tuñón, F.R. Bethencourt, R. Paniagua, B. Fraile, Proapoptotic tumor necrosis factor- α transduction pathway in normal prostate, benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma, *J. Urol.* 170 (2003) 787–790.
- [25] M. Ricote, I. García-Tuñón, F.R. Bethencourt, B. Fraile, R. Paniagua, M. Royuela, Interleukin-1 (IL-1 α and IL-1 β) and its receptors (IL-1RI, IL-1RII, and IL-1Ra) in prostate carcinoma, *Cancer* 100 (2004) 1388–1396.
- [26] C. Nuñez, J.R. Cansino, F. Bethencourt, et al., TNF/IL-1/NIK/NF-kappa B transduction pathway: a comparative study in normal and pathological human prostate (benign hyperplasia and carcinoma), *Histopathology* 53 (2008) 166–176.
- [27] L. Cheng, R. Montironi, D.G. Bostwick, et al., Staging of prostate cancer, *Histopathology* 60 (2012) 87–117.
- [28] J.I. Epstein, W.C. Allsbrook Jr., M.B. Amin, L.L. Egevad, The 2005 international society of urological pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma, *Am. J. Surg. Pathol.* 29 (2005) 1228–1242.
- [29] M. Royuela, M.P. De Miguel, F.R. Bethencourt, M. Sanchez-Chapado, B. Fraile, R. Paniagua, Transforming growth factor B 1 and its receptor types I and II. Comparison in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma, *Growth Factors* 16 (1998) 101–110.
- [30] P. De Miguel, M. Royuela, R. Bethencourt, A. Ruiz, B. Fraile, R. Paniagua, Immunohistochemical comparative analysis of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in normal, hyperplastic and neoplastic human prostates, *Cytokine* 11 (1999) 722–727.
- [31] G. Rodríguez-Berriguete, A. Prieto, B. Fraile, et al., Relationship between IL-6/ERK and NF-kB: a study in normal and pathological human prostate gland, *Eur. Cytokine Netw.* 21 (2010) 241–250.
- [32] G. Swanson, J.W. Basler, Prognostic factors for failure after prostatectomy, *J. Cancer* 2 (2010) 1–19.
- [33] X.F. Guo, J. Wang, S.J. Yu, et al., TNF- α -308 polymorphism and risk of digestive system cancers: a meta-analysis, *World J. Gastroenterol.* 19 (2013) 9461–9471.
- [34] J. Zhao, M.W. Lawless, Stop feeding cancer: pro-inflammatory role of visceral adiposity in liver cancer, *Cytokine* 64 (2013) 626–637.
- [35] O. Golovko, N. Nazarova, P. Tuohimaa, Vitamin D-induced up-regulation of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) in prostate cancer cells, *Life Sci.* 77 (2005) 562–577.
- [36] V. Michalaki, K. Syrigos, P. Charles, J. Waxman, Serum levels of IL-6 and TNF- α correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer, *Br. J. Cancer* 90 (2004) 2312–2316.
- [37] J.R. Cansino, R. Vera, F. Rodríguez de Bethencourt, et al., Prostate specific antigen and NF-kB in prostatic disease: relation with malignancy, *Actas Urol. Esp.* 35 (2011) 16–21.
- [38] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (2011) 646–674.
- [39] S. Rose-John, IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6, *Int. J. Biol. Sci.* 8 (2012) 1237–1247.
- [40] Z. Culig, M. Pühr, Interleukin-6: a multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer, *Mol. Cell. Endocrinol.* 360 (2012) 52–58.
- [41] M. Royuela, G. Rodríguez-Berriguete, B. Fraile, R. Paniagua, TNF-alpha/IL-1/NF-kappaB transduction pathway in human cancer prostate, *Histol. Histopathol.* 23 (2008) 1279–1290.
- [42] E. Voronov, Y. Carmi, R.N. Apte, The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis, *Front. Physiol.* 5 (2014) 114.
- [43] S.F. Shariat, J.A. Karam, J. Walz, et al., Improved prediction of disease relapse after radical prostatectomy through a panel of preoperative blood-based biomarkers, *Clin. Cancer Res.* 14 (12) (2008) 3785–3791.
- [44] S.T. Reis, J. Pontes-Júnior, A.A. Antunes, et al., TGF-B1 expression as a biomarker of poor prognosis in prostate cancer, *Clinics (Sao Paulo)* 66 (2011) 1143–1147.
- [45] J. Gregg, G. Fraizer, Transcriptional regulation of EGR1 by EGF and the ERK signaling pathway in prostate cancer cells, *Genes Cancer* 2 (2011) 900–909.
- [46] P.J. Dłuzniewski, M.H. Wang, S.L. Zheng, et al., Variation in IL10 and other genes involved in the immune response and in oxidation and prostate cancer recurrence, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 21 (10) (2012) 1774–1782.
- [47] Y. Matsuo, H. Sawai, J. Ma, D. Xu, N. Ochi, A. Yasuda, H. Takahashi, H. Funahashi, H. Takeyama, IL-1 α secreted by colon cancer cells enhances angiogenesis: the relationship between IL-1 α release and tumor cells' potential for liver metastasis, *J. Surg. Oncol.* 99 (6) (2009) 361–367.
- [48] C.A. Dinarello, J.W. van der Meer, Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans, *Semin. Immunol.* 25 (6) (2013) 469–484.
- [49] C.A. Dinarello, Interleukin-1 α neutralisation in patients with cancer, *Lancet Oncol.* 15 (6) (2014) 552–553.

ANEXO II: Revisiones

Expression of ERK1 and ERK2 in prostate cancer

Norelia Torrealba,¹ Benito Fraile,¹
Gabriel Olmedilla,²
Pilar Martínez-Onsurbe,²
Manuel Guil-Cid,³ Ricardo Paniagua,¹
Mar Royuela¹

¹Department of Biomedicine and Biotechnology, University of Alcalá, Madrid; ²Department of Pathology, Príncipe de Asturias Hospital, Alcalá de Henares, Madrid; ³Department of Urology, Príncipe de Asturias Hospital, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Abstract

Prostate cancer may emerge as result of dysregulated balance between cell proliferation and death rates, increased angiogenesis and chronic. These processes are regulated by numerous signaling proteins, including the mitogen-activated protein kinases (MAPKs). JNK, p38 and extracellular signal-regulated kinase (ERK) are the three major sub-families of MAPKs. The pro-oncogenic effects of ERK isoforms (ERK1 and ERK2) lie in their aberrant activation through phosphorylation by any mutation along the pathway of receptor tyrosine kinase (RTK)-Ras-Raf-MEK-ERK1/2. Once activated, ERKs phosphorylate cytoskeletal proteins, kinases, and transcription factors. Active ERK proteins induce strong proliferative and anti-apoptotic effects. Our group has tested variations in expression, activation and localization of ERKs in human prostate. Differential ERK1/2 expression and phosphorylation status may be linked to the progression of prostate cancer. The major striking observation is that ERKs are expressed in tumors with higher proportion than normal prostate. We believe that this is an important notion because the status (expression, localization, phosphorylation and the ERK1/ERK2 ratio) of ERK in the prostate may be developed into an important prognostic marker that predicts patient response to the anti-cancer treatment.

Introduction

Prostate cancer is the most common cancer among men worldwide, and is one of the most common causes of cancer-related deaths. It is the second most common cancer diagnosed after lung cancer.¹

The prostate is an accessory male reproductive structure that surrounds the urethra into

the pelvic cavity. The function of the prostate is to provide a series of compounds to ejaculate. Human prostate tissue is divided into two components: glands and stroma. Both are separated by a basement membrane.² The glands are made of two cell types: basal cells and secretory cells. Another cell type can be also observed by the means of special chromogranin A or B staining.²

Prostate cancer (PC) is characterized by slow-growing malignancy associated with a multifocal origin. The majority of these tumors are diagnosed as adenocarcinomas, with its origin in the prostate glands. Prostate tumors grow multifocally in the prostate and rarely produce macroscopic tumor nodules.⁴ Tumor origin seems to be the secretory cells³ although some studies suggest it could also be initiated from basal cells.⁴ However, the pathological diagnosis is based on the absence of basal cells.^{3,4}

The normal adult prostate is in a homeostatic state, as the result of the balance between the rates of proliferation and cell death. The abnormal growth occurs when the proliferation rate exceeds the rate of cell death, or the death rate falls below the rate of cell proliferation.⁵ When the pro-apoptotic pathways are inhibited, the cells can proliferate almost continuously. Such cells lose ability to cease cell cycle, to repair their DNA, or to commit suicide if the DNA damage is not repaired.

Studies on histological-molecular aspects that predict, identify and extend our knowledge about the factors associated with the progression of PC are in high demand. Currently, prostate-specific antigen (PSA), a protein produced by cells of the prostate gland and measured in patient blood sample, serves as high sensitivity organ-specific marker. However, PSA is low specificity marker and thus results in a failure to identify the disease in a significant proportion of patients.⁶ Measurements of other proteins may improve diagnostic specificity for early detection and more accurate grading of PC using the Gleason scale. The Gleason grading system assigns PC a score from 1 to 10 based upon the microscopic appearance of tumor cells. Cancers with a higher Gleason score are less differentiated, more aggressive (tending to form local and distant metastases) and have a worse prognosis for the patient survival rate. Tumors with Gleason scores 8-10 tend to be advanced neoplasms that are unlikely to be cured.

In recent years we have been monitoring variations in expression, activation and localization of MAPKs.⁷ We used samples from human prostate, obtained by radical prostatectomy, transurethral resection and autopsies. We have correlated the results of immunohistochemistry with clinical data of patients, such as PSA levels (pre- and postoperative), Gleason score, presence of metastases, surgical margin

Correspondence: Mar Royuela, Department of Biomedicine and Biotechnology, University of Alcalá, E-28871 Alcalá de Henares (Madrid), Spain.

Fax: +34.91.8854799.

E-mail: mar.royuela@uah.es

Key words: MAPKs; ERK1; ERK2; p-ERK and prostate cancer.

Acknowledgments/Funding: this work was supported by grants from the *Instituto de Salud Carlos III* (P113/01801) of Spain.

Contributions: MR designed the study and carried out the immunohistochemistry and statistical studies; NT created the figures; PM, GO, BF and MG prepared and provided the tumors biological samples and participated in the immunohistochemistry studies; NT and MR edited the paper and commented on the interpretation of the results; MR and RP participated in the study coordination and supervision. All authors read, discussed and approved the final manuscript.

Conflict of interest: the authors declare that they have no conflict interest.

Received for publication: 12 May 2015.

Revision received: 27 November 2015.

Accepted for publication: 27 November 2015.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution NonCommercial 3.0 License (CC BY-NC 3.0).

©Copyright N. Torrealba et al., 2015
Licensee PAGEPress, Italy
MAP Kinase 2015; 4:5265
doi:10.4081/mk.2015.5265

status, cancer recurrence, and patient survival at five years after prostatectomy (surgical removal of prostate).

Positive surgical margin is defined as the presence of tumor extending through the tinted area that represents the place where the urologist has cut to remove the tumor.⁸ Eastham *et al.*⁸ described positive surgical margins between 10% and 48% of patients treated with radical prostatectomy. A positive surgical margin has adverse impact on the probability of progression-free survival, both locally and biochemical, and the development of metastases after radical prostatectomy in multivariate analyzes.⁹ The risk of biochemical progression with positive surgical margin rate has a 1.5 to 2.6 compared to a negative margin.⁸ However, most studies suggest that only a third of patients with positive surgical margin have biochemical progression.⁹

The androgen deprivation therapy is the first-line treatment for metastatic prostate cancer.¹⁰ Decreasing androgen causes tumor regression. Although metastatic patients ini-

tially have a good response to treatment, in almost all patients there is an increase in circulating levels of androgens within 2-3 years. Some patients develop castration resistance.¹⁰ Therefore, understanding the processes that render prostate cancer cell resistant to androgen deprivation therapy is a major challenge. Accordingly, our research is aimed at identifying prognostic markers that may predict possible relapses, development of hormone resistant prostate cancer and, thus find some prognostic factors after radical prostatectomy for preventing early recurrences.

The cell has three similar signaling pathways called mitogen-activated protein kinase (MAPKs) cascades. MAPK pathways are responsible for transmitting extracellular signals evoked by peptide growth factors, hormones, cytokines or various kinds of stress.¹¹ They play important roles in the regulation of cell growth, differentiation, survival, apoptosis, and inflammatory stress. The three major sub-families of MAPKs are JNK (c-Jun NH2-terminal kinase or SAPK), p38 (CSBP) and ERK (extracellular signal-regulated kinase).¹²

JNKs are commonly associated with apoptosis induction, while ERKs are associated with mitogenesis and inversely related to apoptosis. In most biological systems ERKs are associated with proliferation, but in some cases sustained activation of ERK induces cell death or have anti-proliferative effects.¹³ Multiple anti-cancer drugs are seen to induce sustained ERK signaling, as pemetrexed in lung cancer, paclitaxel in esophageal squamous cancer or cisplatin in many different cancer cells.¹⁴ Contradictory effects on cell death have been ascribed to p38.¹³ While ERK1/2 has been attributed a prominently protumoral role, the activation of JNK and p38-MAPK can exert both pro- and anti-tumor effects, which seems to depend on the cell type, stimulus, intensity and duration of the signal, and the interaction with other signaling pathways. Several studies have recently revealed the involvement of MAPKs in cancer associated with inflammation. The chronic inflammation is related to the possibility of developing prostate cancer.^{11,13-16}

Among the signaling pathways most frequently dysregulated in human cancer is the RTK-RAS-RAF-MEK-extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) pathway.^{13,14} In recent years much research has focused on the development of new inhibitors signaling molecules associated with this pathway.^{15,16}

ERK1 and ERK2 are involved in the processes triggered by the arrival of mitogenic growth factors and controls in turn cell proliferation and differentiation.¹⁴ ERK1 and ERK2 are activated when the sequence TEY at their activation loop is dually phosphorylated by MEK1/2 kinases, while located in cytoplasm.¹⁴

The RAS/MAPK cascade is activated by a

variety of growth factors, hormones and cytokines. Upon binding to receptor tyrosine kinases (RTKs), such as epidermal growth factor receptor (EGFR) or transforming growth factor receptor I and II (TGFBR1-TGFBR2). These ligands trigger receptor dimerization and autophosphorylation on the tyrosine residues in the C-terminal region, which provides docking sites for adapter proteins SHC (Src homology 2 domain containing transforming protein 1) and GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2). GRB2 recruits the cytosolic guanine nucleotide exchange factor SOS (Son of Sevenless) to the plasma membrane. Membrane recruitment is sufficient to activate SOS that in turn activates the membrane-bound small GTPase RAS by catalyzing the exchange of GDP with GTP.¹⁴⁻¹⁷ Then, RAS phosphorylates RAF1. In this way, a MAPK cascade is initiated in which RAF1 phosphorylates sequentially MEK1/2 and ERK1/2. Later, ERK1/2 translocate to the nucleus in a process that culminates in modulation of gene transcription through the activation of several transcription factors such as ETS1, ATF-2, c-FOS, c-MYC, ELK1 or NF- κ B.¹⁸ At the same time, it can also phosphorylate cytoplasmic and nuclear kinases, such as MNK1, MNK2, MPKAP2, RSK or MSK1.¹⁹ ERK1/2 are an important checkpoint protein, whose persistent activation may trigger the development of malignancies and play a fundamental role in cancer metastasis.^{14,16,20}

At present, the inhibitors of the kinase function of RAF and MEK represent the most studied and advanced approaches for blocking ERK signaling. There are several inhibitors under evaluation but there are not many inhibitors that directly target ERK. The published data is discussed.^{14,21}

Materials and Methods

All the procedures were examined and approved by the University of Alcalá and Principe de Asturias Hospital Ethics Committees (PI13/1801; 2013/003/20130214) and were in accordance with the ethical standards of the Committee for Human Experimentation, with the Helsinki Declaration of 1975 (revised in Tokyo 2004) and the Committee on Publication Ethics guidelines. This study was performed with the written consent of the patients or their relatives. All pathological, clinical or personal data were anonymized and separated from any personal identifiers. The present study included: i) transurethral resection or radical prostatectomies from 86 men (aged from 52 to 74 years) with PC (Table 1); and ii) histologically normal prostates (NP) obtained at autopsy (8-10 h after death) from 10 men (aged from 20 to 38

years) without histories or reproductive, endocrine or related diseases.

Immunohistochemical study has been performed as shown in previous publications.^{22,23} The primary antibodies used were: rabbit anti-human ERK-1; mouse anti-human ERK-2 and p-ERK (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). The immunostaining expression is the presence or absence of staining in prostate tissue section under study. It is negative when immunohistochemical staining is absent, and positive when staining is observed in the sample. In immunostaining intensity the stain coloration ranging from light pink to deep purple and very classified crosses (+) is observed. In the tumor, the glandular component (acinar and duct) cells are counted with the help of a hematology analyzer by differences according to color staining: weak (1+), moderate (2+) intense (3+) and strong (4+).

In stroma cells are observed microscopically counting the same fields as the tumor and shown as values of percentages. Then both cases are classified depending on the result: Negative (when no staining was observed), low positive, when the result is a cross (1+) and Positive results in high when the crosses are two or more crossings (2+ or greater). These results are used for statistical calculation. The main outcome measure of the study was time to biochemical progression at 10 years, defined as the time between definitive therapy to the first of at least two consecutive elevations in the total serum PSA level above 0.2 ng/mL. Established prognostic variables

Table 1. Clinicopathological features of patients.

	Median (range)
Age (years)	66.00 (52-74)
Preoperative serum PSA (ng/mL)	11.35 (1.4-33)
	% (n)
Preoperative serum PSA (ng/mL)	
<10 ng/mL	36.0 (31)
≥10 ng/mL	64.0 (55)
Gleason score	
<7	82.6 (71)
7	9.3 (8)
>7	8.1 (7)
Clinical T stage	
I	54.7 (47)
II	45.3 (39)
Pathological T stage	
II	65.1 (56)
III	31.4 (27)
IV	3.5 (3)
Perineural invasion (yes)	26.7 (23)
Positive surgical margins	38.4 (33)
Node involvement (yes)	4.7 (4)
Biochemical progression (yes)	33.7 (29)
Survival (yes)	73.3 (63)

included in the study were preoperative serum PSA levels, pathological and clinical T stages, postoperative Gleason score, perineural invasion, lymph node involvement, surgical margin status and overall survival. To evaluate the association between clinicopathological and immunohistochemical variables Spearman's test was performed. Log-rank test and Kaplan-Meier curves were used for survival comparisons. To explore the correlation of the studied immunohistochemical parameters and the established prognostic variables with biochemical progression, univariate and multivariate Cox proportional hazard regression analyses were performed. All statistical analyses²³ were performed using the SPSS 22.0 software (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). P values <0.05 were considered as significant.

Results and Discussion

According to immunostaining data, that our group has previously published²² ERK1 was detected in the cytoplasm of epithelial cells in the 90% of the samples obtained from PC patients (Figure 1A), which was similar to that obtained from normal prostate (Figure 1B) glands (94%).²² In PC samples, ERK1 optical densities were increased with Gleason scores. ERK2 was detected in cytoplasm of the epithelial cells in 100% of samples obtained from normal prostate (Figure 1D) while in PC group (Figure 1C) appeared in 68 % of patients.²² Optical density was the highest in PC, but no differences between Gleason groups. The p-ERK was found in the cytoplasm in 40% of normal prostate (Figure 1F) and 30% of PC samples.²² The highest optical density was observed in PC (Figure 2E) but no differences were found in Gleason score.²² Several authors showed that ERK is important in the progression of the malignancy in prostate cancer. We saw in our patients with PC a significant expression of ERK, perhaps related with cancer progression. Imada *et al.*²⁴ described the biochemical relevance of ERK to the progression of PC, while according to our results Gioeli *et al.*²⁵ found the correlation between the increase in ERK activation and advanced PC grade and stage. The normal prostate is composed of glands and stroma. We analyzed the differences of ERK expression in the prostatic stromal and tumor cells. The presence of ERK was indicated as positive result, whereas absence of antibody reactivity with ERK1, ERK2 or their phosphorylated forms (p-ERK) was considered as negative result (Table 2 - Expression). Then, the staining intensities of ERK1, ERK2 and p-ERK were evaluated between stroma and tumor locations (Table 2 - Intensity).

We see as ERK1 is expressed in tumor with

Table 2. Distribution of ERK-1, ERK-2 and p-ERK in PC samples (86) based on immunostaining score for expression and intensity.

Expression		N % (n)	Immunostaining score	
			P-L % (n)	P-H % (n)
Stroma	ERK-1	4.7 (4)	10.5 (9)	84.9 (73)
	ERK-2	38.4 (33)	16.3 (14)	45.3 (39)
	p-ERK	70.9 (61)	15.1 (13)	14.0 (12)
Tumor	ERK-1	5.8 (5)	1.2 (1)	93.0 (80)
	ERK-2	31.4 (27)	8.1 (7)	60.5 (52)
	p-ERK	69.8 (60)	9.3 (8)	20.9 (18)

N, negative; P-L, Positive-low; P-H, Positive-high. Modified by Rodriguez-Berriguete *et al.*, 2010.²²

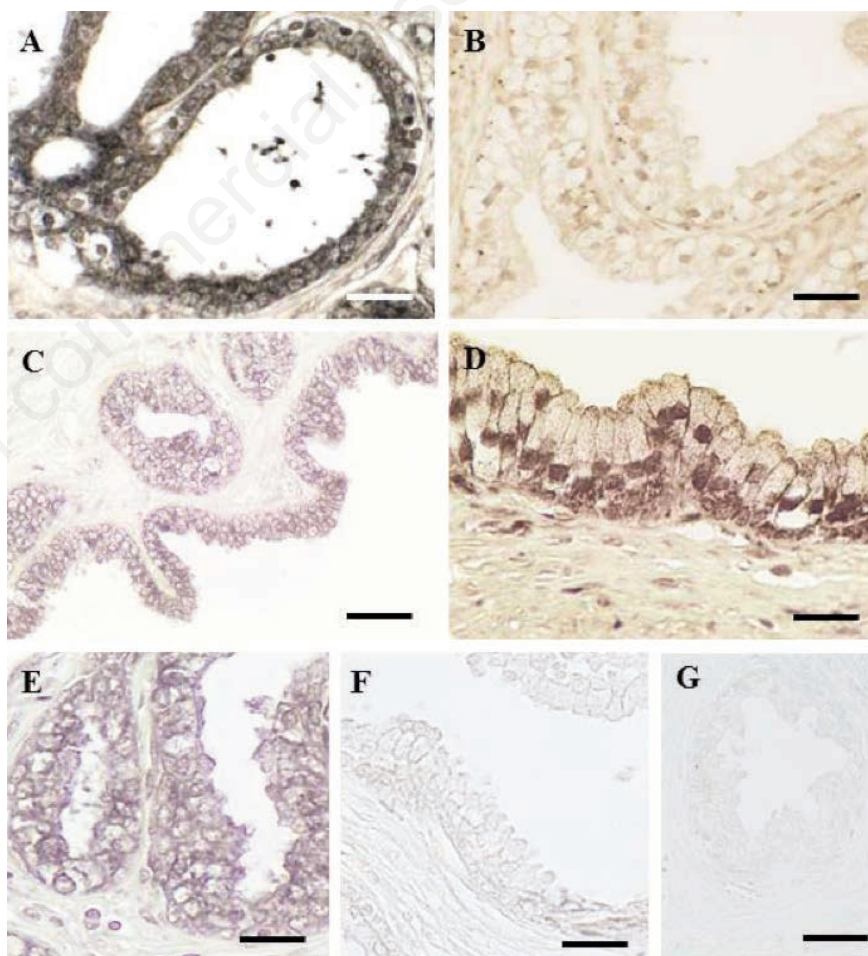


Figure 1. ERK-1 (A, B) ERK2 (C, D), p-ERK (E, F) and negative control (G) in cancer (A, C, E) and normal prostate (B, D, F, G). Scale bars: 30 μ m (C, G), 25 μ m (A), 20 μ m (B, E, F) and 15 μ m (D).

higher proportion than ERK2 and p-ERK. Also, we see the intensity in tumor for ERK1 has a higher proportion to ERK2 and p-ERK. For the stroma, the proportions are similar with those described above. Several authors have described as p-ERK is significantly decreased in PC. The authors see that in PC3 and DU145 cells (hormonal independent advanced prostate cancer cells) levels of expression for the members RAS/RAF/MEK/ERK cascades are low. The deletion of PTEN gene in PC could play a role in the suppression of this pathway.²⁶

In this analysis, *r* is the correlation coefficient and *P* marks a statistical significance. The correlation coefficient may range from -1 to 1, where -1 or 1 indicates a *perfect* relationship. The further the coefficient is from 0, regardless of whether it is positive or negative, the stronger the relationship between the two variables. Therefore, a coefficient of -0.213 is almost as strong as a coefficient of 0.241. Positive coefficients tell us that there is a direct relationship: when one variable increases, the other increases. Negative coefficients tell us that there is an inverse relationship: when one variable increases, the other one decreases.

ERK1 expression in stroma has indirect relation with nodal involvement (Table 3 - Stroma) and with positive margins surgical in stromal intensity (Table 3 - Stroma). ERK activation is correlated with increasing of Gleason score, and these patients have a malignancy

progression.^{26,27} Uzgare *et al.*²⁷ and Junttila *et al.*¹⁸ demonstrated in TRAMP (transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate), that ERK activation has effects in prostatic epithelial cells, and it produces the tumor. ERK has differentially expressed and activated during prostate cancer progression. These authors think that the inactivation of ERK has a relationship with the emergence of a poorly differentiated metastatic and androgen-independent phenotype. Koul *et al.*²⁸ showed in PC3 cell line that ERK signal transduction pathway has essential paper for cell migration, invasion and clonogenic activity. This clonogenic activity causes cells with the capacity to proliferate a colony of genetically identical cells.

In our patients, p-ERK is related in a direct manner with pathological T stage and indirectly with the survival of patients in the case of the expression in the stroma (Table 3 - Stroma) and epithelium (Table 3 - Tumor). Intensity in tumor patients also stores relationships with the presence of p-ERK in the same manner (Table 3 - Tumor).

After evaluating the correlation of our MAP kinase, we studied the survival curves of Kaplan-Meier. Survival curves for classic markers confirmed the forecast for biochemical recurrence, T value pathological stage (P=0.051), Gleason score (P=0.003) and lymph node metastasis (P=0.000) but not for preoperative serum PSA and perineural invasion, positive surgical margins.²³

The regression model for univariate Cox proportional hazards were used to study the association between each variable separately study the event of interest (time of biochemical recurrence) providing hazard ratio (Hazard ratio) which estimates differences in risk of experiencing the effect of interest between different groups of patients. It also allows us to corroborate the results of the Kaplan-Meier.²³ In this review we have added charts Kaplan-Meier classical markers to demonstrate that the values of Log rank are corroborated in the study of univariate Cox provided contrary to the values obtained in the survival curves of cytokines study showing no significant values.²³

We performed a Univariate Cox analysis of classical markers; also we performed analysis for biochemical recurrence.²³ We note that the pathological T stage, Gleason score and node involved relate to biochemical recurrence-free time (Table 4), thus fulfilling our patient group some classical predictions.

We performed survival curves of Kaplan-Meier for the cytokines of the study and we evaluated the univariate Cox. In this group of patients, we did not obtained significant results for any cytokines. We also did not find data in this regard in the literature.

Ricote *et al.*²⁹ demonstrated that p-ERK has an important role in the increase of proliferation in LNCaP cells; in this study p-ERK was notably increased by TNF- α .

Table 3. Correlation between immunohistochemical variables and clinicopathological features for expression and intensity.

	Stromal expression						Stromal intensity					
	ERK-1		ERK-2		p-ERK		ERK-1		ERK-2		p-ERK	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Preoperative serum PSA	-0.501	0.642	-0.094	0.387	0.107	0.325	-0.113	0.301	-0.018	0.873	0.076	0.486
Pathological T stage	-0.102	0.322	0.075	0.491	0.241	0.025	-0.050	0.647	0.163	0.134	0.201	0.063
Clinical T stage	-0.021	0.850	0.142	0.191	-0.017	0.874	0.054	0.624	0.134	0.219	-0.054	0.623
Gleason score	-0.189	0.081	-0.141	0.194	-0.024	0.824	-0.076	0.485	-0.099	0.363	-0.009	0.931
Perineural invasion	0.009	0.937	0.099	0.366	0.192	0.077	0.034	0.756	0.036	0.740	0.147	0.176
Node involvement	-0.213	0.049	-0.053	0.629	0.102	0.351	-0.077	0.482	-0.015	0.895	0.144	0.186
Positive surgical margins	-0.053	0.629	0.033	0.766	-0.031	0.775	-0.259	0.016	0.045	0.681	-0.013	0.407
Biochemical progression	0.041	0.710	0.006	0.953	-0.023	0.831	0.029	0.793	0.056	0.608	-0.015	0.209
Survival	0.133	0.221	-0.009	0.931	-0.213	0.049	0.045	0.680	0.043	0.693	-0.188	0.084
	Tumoral expression						Tumoral intensity					
	ERK-1		ERK-2		p-ERK		ERK-1		ERK-2		p-ERK	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Preoperative serum PSA	-0.083	0.447	-0.143	0.190	0.231	0.033	-0.020	0.856	-0.161	0.139	0.219	0.043
Pathological T stage	-0.055	0.613	0.070	0.520	0.271	0.012	-0.020	0.854	0.056	0.611	0.239	0.026
Clinical T stage	0.027	0.807	0.163	0.133	0.011	0.923	0.064	0.559	0.106	0.333	-0.009	0.932
Gleason score	-0.148	0.175	-0.151	0.165	-0.002	0.348	-0.117	0.282	-0.185	0.088	-0.103	0.347
Perineural invasion	-0.074	0.496	0.069	0.527	0.174	0.109	-0.043	0.693	0.029	0.793	0.173	0.111
Node involvement	-0.181	0.095	-0.089	0.418	0.095	0.348	-0.159	0.144	-0.064	0.556	0.116	0.288
Positive surgical margins	-0.110	0.311	0.019	0.865	0.001	0.991	-0.157	0.149	0.074	0.498	-0.029	0.793
Biochemical progression	-0.033	0.763	-0.047	0.664	0.012	0.909	0.000	1.000	-0.036	0.745	0.009	0.937
Survival	0.038	0.721	-0.044	0.687	-0.226	0.036	0.061	0.576	-0.049	0.654	-0.224	0.038

Bold values indicate significant correlations.

Table 4. Univariate Cox proportional hazard regression analysis for biochemical progression according to classical markers.

	P value	Hazard ratio (95% CI)
Preoperative serum PSA	0.146	1.879 (0.802-4.401)
Pathological T stage	0.017	2.017 (1.132-3.595)
Gleason score	0.000	2.966 (1.818-4.838)
Perineural invasion	0.077	1.971 (0.930-4.177)
Node involvement	0.001	6.166 (2.068-18.318)
Positive surgical margins	0.404	1.367 (0.657-2.844)

P<0.05 is considered as statistically significant. Bold values indicate significant correlations. CI, confidence interval.

Shimada *et al.*²⁶ has been described the status of activated phosphorylated ERK in human prostate cancer cells with pathological parameters; ERK cannot be activated without being phosphorylated at the same time unless it is a mutant. They suggested that the activation of ERK signaling is related with prostate cancer progression. ERK is commonly considered as anti-apoptotic, cell growth-related kinase, and as such ERK activation favors clinical tumor progression. ERK is associated with malignancies and for this is investigated in several studies. In other tumors as breast, lung, colon and stomach, the role of ERK in the progression and tumor development also has been described.^{30,31}

Our research group showed the important role of the IL6/ERK transduction pathway in the activation of NF- κ B in these patients.^{26,27} IL6/ERK transduction pathway stimulated the translocation of NF- κ B to the nucleus in PC. NF- κ B in the nucleus promotes the expression of inhibitors of apoptosis proteins and BCL2, and this is relation with the malignance of the tumor.^{13,22,23} Our large experience makes us think that the use of these parameters could be a useful tool in clinic-pathological practice.

In the last decade, researchers have progressed in the knowledge of prostate cancer initiation, progression and biomarkers associated with progression of disease. Several studies associate ERK with a pro-tumor role. ERK is involved in several transduction pathways such as IL6/ERK/NF- κ B related with advanced malignance and the molecular roles of ERK are not known at all. The aim of future studies might be directed in the knowledge of the different mechanisms that provoke pro-tumor effect of ERK, in order to finding effective therapeutic targets that could reduce the effect of ERK in prostate cancer.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.

- Cunha GR. Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future. *Differentiation* 2008;76:578-86.
- Xin L. Cells of origin for cancer: an updated view from prostate cancer. *Oncogene* 2013;32:3655-63.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
- Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1228-42.
- Roddam AW, Duffy MJ, Hamdy FC, et al. 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;48:386-99.
- Rodríguez-Berriguete G, Prieto A, Fraile B, et al. Relationship between IL-6/ERK and NF- κ B: a study in normal and pathological human prostate gland. *Eur Cytokine Netw* 2010;21:241-50.
- Eastham JA, Kuroiwa K, Ohori M, et al. Prognostic significance of location of positive margins in radical prostatectomy specimens. *Urology* 2007;70:965-9.
- Swindle P, Eastham JA, Ohori M, et al. Do margins matter? The prognostic significance of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens. *J Urol* 2005; 174:903-7.
- Steinestel J, Schrader AJ, Luedeke M. Resistance to androgen-pathway drugs in prostate cancer. *N Engl J Med* 2014;371: 2234.
- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev* 2012;92:689-737.
- Frank SB, Miranti CK. Disruption of prostate epithelial differentiation pathways and prostate cancer development. *Front Oncol* 2013;3:273.
- Rodríguez-Berriguete G, Fraile B, Martínez-Onsurbe P, et al. MAP kinases

and prostate cancer. *J Signal Transduct* 2012;2012:169170.

- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1263-84.
- Huang P, Han J, Hui L. MAPK signaling in inflammation-associated cancer development. *Protein Cell* 2010;1:218-26.
- Frémin C, Meloche S. From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol* 2010;3:8.
- Zhang Y, Chen HX, Zhou SY, et al. Sp1 and c-Myc modulate drug resistance of leukemia stem cells by regulating survivin expression through the ERK-MSK MAPK signaling pathway. *Mol Cancer* 2015;14:56.
- Junttila MR, Li SP, Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J* 2008;22:954-65.
- Zebisch A, Czernilofsky AP, Keri G, et al. Signaling through RAS-RAF-MEK-ERK: from basics to bedside. *Curr Med Chem* 2007;14:601-23.
- Peng S, Zhang Y, Zhang J, et al. ERK in learning and memory: a review of recent research. *Int J Mol Sci* 2010;11:222-32.
- Goetz EM, Ghandi M, Treacy DJ, et al. ERK mutations confer resistance to mitogen-activated protein kinase pathway inhibitors. *Cancer Res* 2014;74:7079-89.
- Rodríguez-Berriguete G, Prieto A, Fraile B, et al. Relationship between IL-6/ERK and NF- κ B: a study in normal and pathological human prostate gland. *Eur Cytokine Netw* 2010;21:241-50.
- Rodríguez-Berriguete G, Sánchez-Espiridión B, Cansino JR, et al. Clinical significance of both tumor and stromal expression of components of the IL-1 and TNF- α signaling pathways in prostate cancer. *Cytokine* 2013;64:555-63.
- Imada K, Shiota M, Kohashi K, et al. Mutual regulation between Raf/MEK/ERK signaling and Y-box-binding protein-1 promotes prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 2013;19:4638-50.
- Gioeli S, Mandell JW, Petroni GR, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res* 1999;59:279-84.
- Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Konishi N. Molecular roles of MAP kinases and FADD phosphorylation in prostate cancer. *Histol Histopathol* 2006;21:415-22.
- Uzgare AR, Kaplan PJ, Greenberg NM. Differential expression and/or activation of P38MAPK. Erk 1/2 and jnk during the initiation and progression of prostate cancer. *Prostate* 2003;55:128-39.

28. Koul S, Huang M, Chaturvedi L, et al. p42/p44 Mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway regulates interleukin-6 expression in PC3 cells, a line of hormone-refractory prostate cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1030:253-7.
29. Ricote M, García-Tuñón I, Fraile B, et al. P38 MAPK protects against TNF-alpha-provoked apoptosis in LNCaP prostatic cancer cells. *Apoptosis* 2006;11:1969-75.
30. Royuela M, Arenas MI, Bethencourt FR, et al. Regulation of proliferation/apoptosis equilibrium by mitogen-activated protein kinases in normal, hyperplastic, and carcinomatous human prostate. *Hum Pathol* 2002;33:299-306.
31. Tahir AA, Sani NF, Murad NA, et al. Combined ginger extract & Gelam honey modulate Ras/ERK and PI3K/AKT pathway genes in colon cancer HT29 cells. *Nutr J* 2015;14:31.

Non commercial use only

