



UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica.

Tesis Doctoral

ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO SOBRE LA EXPRESIÓN Y
DISTRIBUCIÓN DE LA SUSTANCIA P Y DEL RECEPTOR NK1 EN LA
PRÓSTATA HUMANA NORMAL Y PATOLÓGICA.

Doctorando: Luis Gabriel Luque Romero

Tutora: Prof^a. Dra. María Carmen Garnacho Montero

Directores: Dr. Miguel Muñoz Sáez, Dr. Juan Manuel Segura Sánchez

A mi mujer e hijos

“Te quejas de las censuras de tus maestros, émulos y adversarios, cuando deberías agradecerlas. Sus golpes no te hieren; te esculpen.”

D. Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)

Médico español. Premio Nobel de Medicina 1906

“Somos como enanos a los hombros de gigantes. Podemos ver más, y más lejos que ellos, no porque la agudeza de nuestra vista ni por la altura de nuestro cuerpo, sino porque somos levantados por su gran altura.”

Mons. Juan de Salisbury (c. 1120-1180).

Obispo de Chartres y diplomático inglés.

Agradecimientos

Agradecimientos

A mis profesores y tutores

A mi tutora y a mis directores de tesis en cuyos hombros tuve que subirme para alcanzar los conocimientos científicos que mi cortedad no me permitía ver (parafraseando a Bernardo de Chartres de su obra *Metalogicon* de 1159). A ellos, por la paciencia que han demostrado conmigo, por su amistad y generosidad (en todos los sentidos), por transmitirme su saber, y animarme a llevar a cabo este proyecto. A los tres mi más sincero agradecimiento.

A la Prof^a. Dra. Amparo Gómez Pascual, mi “tutora”, compañera y mejor amiga, por sus enseñanzas y su tutela durante toda mi carrera pre y postgrado. Una carrera con muchos obstáculos y vueltas. Sin su ayuda, el camino hubiera tenido una senda mucho más tortuosa y dura.

A mis compañeros y amigos

A mi amigo, compañero y referente científico-profesional, Prof. Dr. José Antonio Coello Suanzes, por su inestimable apoyo en los momentos más duros de mi vida personal y profesional.

A mi amigo y compañero profesional y de doctorado D. Carlos Escudero Severín, con quién he compartido momentos de alegría y de desazón, porque sin su apoyo y humor, esta obra no se hubiera concluido nunca.

A los Dres. Ernesto Salas Herrero y Manuel Salguero Villadiego por brindarme su amistad y ayuda en todos los momentos de mi vida.

A todas las personas del Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica, que me han enseñado lo que se sabe sobre las bases celulares y genéticas de la enfermedad y sobre el procesamiento de tejidos, desde el personal administrativo (Rosa y Manolo) hasta sus responsables, pasando por profesores (Dras. Carmen Fernández-Novoa, María Victoria San Martín, María Ángeles Novales [EPD], María Victoria González, Inés Martín-Lacave, Ana María Fernández, Ana María Moreno, María Teresa Vargas, Mercedes Giner, José Carmelo Utrilla, Manuel de Miguel, José María Fernández, María Victoria Vázquez y personal técnico y de apoyo, Ana, Marcos y Auxi). Sinceramente, espero no haberme dejado a nadie detrás, debido a mi mala memoria, sería una injusticia. En este Departamento entré poco después de la mayoría de edad, y aún sigo disfrutando de sus largos y tortuosos pasillos por los que suelo ir silbando cualquier melodía para evitar sobresaltar a nadie.

Al personal del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen Macarena de Sevilla, desde sus Jefes de Servicio (Prof. Galera, Cámpora y Ríos) pasando por sus facultativos especialistas de área, personal técnico, de apoyo y administrativas. Con un agradecimiento especial a Emilia y Reme que me iniciaron junto a la Dra. Gómez y al Dr. Hevia a mirar las muestras para microscopía electrónica, a Carmen Fernández y a Loli Jiménez por enseñarme las técnicas inmunohistoquímicas y a usar el microtomo. Y un recuerdo especial a aquellos con los que empecé a amar esta especialidad Dres. Villar, Ríos, Vázquez y Llamas. Y a mis profesores de Anatomía Patológica, los Dres. Ortega, Fernández-Sanz [EPD], Torres, Otal, Díaz, Rivera, Armas, etc.

A la Dra. D^a. Inmaculada Bueno Rodríguez, por su amistad y haberme propuesto unirme a esta línea de investigación para desarrollar esta tesis doctoral. Y a su familia por ser grandes amigos y personas a las que aprecio.

Al Profesor Dr. D. Ángel Vilches Arenas por su amistad, ayuda en los últimos meses de este trabajo y asesoramiento desinteresado en los aspectos metodológicos y en la elaboración de los resultados y discusión.

A D^a Rosario Vigo Ortega, enfermera de investigación por su apoyo y ayuda en la traducción y en la elaboración de algunas partes de este manuscrito.

A Daniel Arenas Jiménez por su ayuda técnica en la preparación de las muestras histológicas.

A mis compañeros del Servicio Andaluz de Salud que siguen confiando en mí para embarcarse en la aventura de la investigación y a mis jefes que confiaron en mí para realizar la labor de promover la investigación en Atención Primaria.

A mi familia

A mi mujer, María Pilar, por su AMOR, ayuda, paciencia y aliento en los momentos malos y buenos que hemos pasado durante la elaboración de esta obra y de la obra más importante para mí: mi familia y *mi propia vida*.

A mis hijos por haberles robado tiempo cuando más lo necesitaban. Siempre han estado a mi lado y me han dado su cariño a pesar de haberles faltado en algunos momentos esenciales para ellos. De todos y cada uno de ellos me siento orgulloso. Agradezco a mi hijo Luis que tenga la misma ilusión que yo

por conocer, los ratos de despacho que hemos compartido mientras escribía este texto y los momentos tan emocionantes que hemos vivido juntos; a mi hijo Gabriel el esfuerzo que hace cada día por mejorar y encontrar su camino, y alegrías y emociones que me ha reportado; a Pilina su cariño y esfuerzo por conseguir su objetivo profesional; y a Daniel sus ganas de investigar, explorar y lo cariñoso que es.

A mis padres, hermanos naturales y políticos, a mis sobrinas y sobrinos, tíos y primas /os, y a toda mi familia por darme la energía necesaria para acabar este trabajo y otras muchas obras eternamente inacabadas de mi vida.

Una mención especial a mi hermano Mariano, artista y gran pintor por su ayuda en la elaboración de las ilustraciones, a mi hermano Ignacio por sus aportaciones científicas a José Manuel por el estímulo que me ha dado para innovar, a Enrique por ser la persona con el corazón “más generoso” que conozco, y a mi pequeña Isa por su cariño a pesar de la distancia. A todos ellos por el amor, respeto y confianza que nos procesamos mutuamente. Y como no, a mis padres que me dieron la oportunidad de venir al mundo y crecer en la familia que ellos han ido creando cada día. A ms padrinos que me han arropado en todo momento, por su amor sincero.

A todas las personas que me han querido, ayudado y apoyado durante los 22 años de peregrinación por la ciencia intentando acabar el proyecto de alcanzar la titulación de Doctor en Medicina.

A todos los que en mi familia y fuera de ella luchan día a día contra el cáncer con la esperanza de haber aportado un granito de arena a la guerra contra esta enfermedad.

Índices de contenidos, tablas y figuras

Índice de abreviaturas

Abreviatura	Significado
34βE12	Anticuerpo específico para citoqueratinas de alto peso molecular 1, 5, 10 y 14
AECC	Asociación Española contra el Cáncer
AJCC	American Joint Commite on Cancer
AKT	Serina/treonina proteín-quinasa específica
AMACR	a-metilacil-CoA-racemasa
AMPc	Adenosín-monofosfato cíclico (AMP cíclico)
AP-1	Proteína activadora 1
BMP-4	Proteína morfogenética ósea 4
CAF	Fibroblasto asociado al cáncer
CAP	Colegio Americano (estadounidense) de patólogos
CD63	Complejo hemoglobina-haptoglobina de macrófagos
CDKN1B	inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1B
CHEK2	Check point quinasa 2 (gen supresor tumoral)
CK	Citoqueratina
CK14	Citoqueratina de alto peso molecular 14
CK18	Citoqueratina de bajo peso molecular 18
CK5	Citoqueratina de alto peso molecular 5
CK5/6	Citoqueratina de alto peso molecular 5/6
CK8	Citoqueratina de bajo peso molecular 8
cm	Centímetro
CMV	Citomegalovirus
COX-2	Ciclooxygenasa 2
CPr	Adenocarcinoma de próstata
CSC	Células madres de cáncer
DHT	Dihidrotestosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECM	Matriz extracelular
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EKA	Endoquinina A
EKB	Endoquinina B
ETS	Familia de factores de transcripción ETS
FGF-10	Factor 10 de crecimiento de fibroblastos
GCO	Observatorio Global del Cáncer
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GRK	Kinasa del receptor acoplado a proteína G
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo
HBP	Hiperplasia benigna de próstata
H-E	Hematoxilina-eosina

HHV8	Virus del herpes humano tipo 8
HMGCR	Mevalonato 3-hidroxi-3- metilglutaril-CoA reductasa
HMGCS1	Mevalonato 3-hidroxi-3- metilglutaril-CoA sintasa 1
HMWCK	Citoqueratina de alto peso molecular
Hoxa 13	Proteína del Homeobox A13
Hoxd 14	Proteína del Homeobox D13
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HPV	Virus de papiloma humano
HSV2	Virus del herpes simple tipo 2
IARC	Agencia Internacional para la investigación en Cáncer
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquinas
INE	Instituto Nacional de Estadística
IPN	Invasión perineural
IκB	Inhibidor del factor nuclear de cadenas ligeras potenciador de células B
kDa	Kilodalton
LNCaP	Línea celular de cáncer de próstata
MAPK	Proteín-quinasa activada por mitógeno
mCRPC	Cáncer de próstata metastásico resistente a la castración
MIP-1α	Proteína inflamatoria de los macrófagos 1 alfa
mm	milímetro
μm	micra, micrómetro
mRNA	RNA mensajero
mtSNV	Polimorfismo de un único nucleótido a nivel del DNA mitocondrial
MVA	vía del mevalonato
NF-κB	Factor nuclear unido a cadenas ligeras Kappa potenciador de células B activadas
NK-1R	Receptor de la neuroquinina 1
NK-2R	Receptor de la neuroquinina 2
NK-3R	Receptor de la neuroquinina 3
NK-4R	Receptor de la neuroquinina 4
NKA	Neuroquinina A
NKB	Neuroquinina B
NK-R	Receptor de neuroquinina
NKX3	Proteína Nkx-3 de Homeobox
OMS	Organización Mundial de la salud
p27	Proteína de la familia CIP (proteína que interacciona con CDK)/KIP(proteína inhibidora de la quinasa)
p27/Kip1	gen miembro de la familia de las CDK
p63	Proteína relacionada con la transformación tumoral 63 (gen supresor)
PAP	Fosfatasa ácida prostática específica
PGE-2	Prostaglandina E-2
PI3K	Fosfatidil inositol-1,4,5 bifosfato quinasa
PIA	Atrofia inflamatoria proliferativa
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
PIN-AG	Neoplasia intraepitelial de alto grado
PKC	Proteín-quinasa C

PK α	Proteín-quinasa alfa
PLA2	Fosfolipasa A2
PLC- β	Fosfolipasa C beta
PPT-A	Preprotaquinina A
PSA	Antígeno prostático específico
PTEN	Gen supresor de tumores homólogo a fosfatasa y tensina (gen supresor tumoral)
REDECAN	Red Española de Registros del Cáncer
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real
SEAP	Sociedad Española de Anatomía Patológica
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
Shh	Proteína del gen Sonic hedgehog
shRNA	RNA corto de interferencia
SNP	Polimorfismo de un único nucleótido
SP	Sustancia P
TGF α	Factor de crecimiento transformante alfa
TGF- β_1	Factor de crecimiento transformante beta 1
TMA	<i>Microarray</i> de tejido
TMPRSS2	Proteasa transmembrana de serina 2
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
tRNA Arg	RNA transferente de Arginina
tRNA Thr	RNA transferente de Treonina
TURP	Resección prostática transuretral
α PPT-A	mRNA alfa de Preprotaquinina A
β PPT-A	mRNA beta Preprotaquinina A
γ PPT-A	mRNA gamma Preprotaquinina A

Índice de contenidos

1	INTRODUCCIÓN.....	11
1.1	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	11
1.2	LA PRÓSTATA.....	12
1.2.1	<i>Anatomía de la próstata.....</i>	<i>12</i>
1.2.1.1	Relaciones anatómicas de la próstata.....	17
1.2.1.1.1	Relaciones intrínsecas	18
1.2.1.1.2	Compartimento prostático	20
1.2.1.1.3	Relaciones extrínsecas.....	22
1.2.1.2	Irrigación arterial de la próstata	25
1.2.1.3	Drenaje venoso y linfático de la próstata	26
1.2.1.4	Inervación de la próstata	27
1.2.2	<i>Embriología</i>	<i>28</i>
1.2.3	<i>Evolución postnatal de la próstata</i>	<i>31</i>
1.2.4	<i>Histología</i>	<i>32</i>
1.2.4.1	Clínica e histología de la próstata normal.....	32
1.2.4.2	Clínica e histología de la hiperplasia benigna de la próstata	37
1.2.5	<i>El cáncer de próstata.....</i>	<i>39</i>
1.2.5.1	Generalidades del Cáncer	49
1.2.5.2	Etiopatogenia del cáncer de próstata.....	55
1.2.5.3	Aspectos clínicos del cáncer de próstata	57
1.2.5.4	Aspectos genéticos y moleculares del cáncer de próstata.....	59
1.2.5.4.1	Genoma mitocondrial y cáncer de próstata	60
1.2.5.5	Cáncer de próstata y microambiente.....	62
1.2.5.6	Cáncer de próstata e inflamación	65
1.2.5.7	Aspectos histopatológicos del cáncer de próstata.....	69
1.2.5.7.1	Morfología y celularidad.....	69
1.2.5.7.2	Expresión antigénica, marcadores inmunohistoquímicos	72

1.2.5.7.3	Marcadores de células basales citoqueratinas	73
1.2.5.8	Sistemas de estadificación del cáncer de próstata	79
1.2.6	<i>Epidemiología</i>	86
1.2.7	<i>Etiología</i>	86
1.2.8	<i>Incidencia</i>	87
1.2.9	<i>Mortalidad</i>	93
1.2.10	<i>Prevalencia</i>	94
1.2.11	<i>Supervivencia</i>	96
1.4	LA SP Y EL RECEPTOR NK-1R	99
1.4.1	<i>Generalidades de la SP/NK-1R</i>	99
1.4.1.1	Breve reseña histórica	101
1.4.2	<i>Neuropéptidos</i>	110
1.4.2.1	Biosíntesis de los neuropéptidos	116
1.4.3	<i>Localización y distribución de la SP</i>	119
1.4.4	<i>Efectos fisiológicos de la SP</i>	121
1.4.5	<i>Efectos fisiopatológicos de la SP</i>	123
1.4.5.1	SP y nocicepción.	123
1.4.5.2	SP y depresión.....	124
1.4.5.3	SP y cáncer.	124
1.4.5.4	SP y sistema inmune.	125
1.4.5.5	SP e inflamación.....	126
1.4.5.6	SP y neoangiogénesis.....	127
1.4.5.7	SP y aparato digestivo.....	128
1.4.6	<i>Receptores taquicinérgicos</i>	131
1.4.7	<i>El receptor NK-1R</i>	137
1.4.8	<i>La SP/NK-1R y su relación con la patología en general: dolor, inflamación, cáncer</i> 140	
1.4.8.1	Beneficios de la SP/NK-1R como diana terapéutica en la inflamación y el cáncer.....	148

1.4.9	<i>Antagonistas NK-1R</i>	150
1.6	JUSTIFICACIÓN Y PERTINENCIA.....	155
1.5	PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	159
1.6	HIPÓTESIS	163
1.8	OBJETIVOS	167
1.8.1	<i>General</i>	167
1.8.2	<i>Específicos</i>	167
2	MATERIAL Y MÉTODOS	171
2.1	POBLACIÓN.....	171
2.1.1	<i>Criterios de selección</i>	171
2.1.1.1	Criterios de inclusión	171
2.1.1.2	Criterios de exclusión.....	171
2.2	DISEÑO.....	172
2.3	ÁMBITO.....	172
2.4	PERIODO DE ESTUDIO.....	172
2.4.1	<i>Muestra</i>	172
2.4.1.1	Tamaño muestral	172
2.4.1.2	Técnica de muestreo.....	173
2.5	VARIABLES DE ESTUDIO	174
2.5.1	<i>Dependientes</i>	174
2.5.2	<i>Independientes</i>	174
2.6	FUENTES DE DATOS.....	174
2.7	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	175
2.7.1	<i>Realización de cortes y preparación de muestras</i>	175
2.7.2	<i>Construcción de la matriz de tejido (Tissue Micro Arrays, TMA)</i>	176
2.7.3	<i>Descripción del método inmunohistoquímico</i>	177
2.7.4	<i>Valoración e interpretación de los resultados</i>	179

2.7.5	<i>Limitaciones de los instrumentos de medida</i>	180
2.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	181
2.8.1	<i>Análisis univariante</i>	181
2.8.2	<i>Análisis bivariante</i>	182
2.8.3	<i>Análisis de supervivencia</i>	183
2.9	CONSIDERACIONES BIOÉTICAS	184
3	RESULTADOS.....	189
2.10	ANÁLISIS EXPLORATORIO DE LA MUESTRA	189
2.11	ANÁLISIS UNIVARIANTE	189
2.12	ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTICUERPOS ANTI SP Y ANTI NK-1R	192
2.13	ANÁLISIS BIVARIANTE.....	197
2.14	ANÁLISIS DE CORRELACIONES BIVARIADAS	204
2.15	ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA.....	205
4	DISCUSIÓN	219
2.16	LIMITACIONES Y SESGOS.....	219
2.17	RESULTADOS PRINCIPALES DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA EXPRESIÓN DE LA SP Y NK-1R EN EL ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA.....	222
2.18	POSIBLES USOS CLÍNICOS DE LOS ANTAGONISTAS DEL NK-1R EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA	242
2.20	PROPUESTAS DE ESTUDIO FUTUROS.....	246
5	CONCLUSIONES.....	249
6	BIBLIOGRAFÍA.....	253
4	ANEXOS	315

4.1	ANEXO I, CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE ÉTIAC DE LA INVESTIGACIÓN DE LOS HOSPITALES UNIVERSITARIOS VIRGEN MACARENA Y VIRGEN DEL ROCÍO DE SEVILLA	315
4.2	ANEXO II, TABLA DE DEFINICIÓN DE VARIABLES	317

Índice de Figuras

Figura 1. Probabilidad de desarrollar un CPr invasor entre el momento del nacimiento y la edad seleccionada. Modificado de Galcerán et al, 2015. 89

Figura 2. Incidencia de cáncer en hombres a nivel mundial en 2012 (ASR (W): razón estandarizada por edad referida a la población mundial) 92

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1. Corte axial de la próstata humana para ilustrar su estructura y relaciones. 14

Ilustración 2. Corte axial y sagital de la próstata humana y los conductos eyaculadores. Modificado de Kierszenbaum y Tres, 2012. 15

Ilustración 3. Mapa de distribución de CPr por países europeos. Tasas de incidencia (a) y mortalidad (b) estimadas ajustadas por edad a la población europea. Modificado de ECIS European Cancer Information System (Comisión Europea) disponible: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>. 91

Ilustración 4. Vías de acción de la SP (Tomado de Muñoz M, Coveñas, R, Esteban F, y Redondo M; 2015). 100

Ilustración 5. Modelo tridimensional de la sustancia P. 106

Ilustración 6. Diferencias entre las neuronas aminérgicas y peptidérgicas. 113

Ilustración 7. Genes de las preprotaquicinas, su localización cromosómica, mRNAs y péptidos codificados.....	118
Ilustración 8. Representación esquemática del mecanismo molecular en la comunicación entre células nerviosas y mastocitos	126
Ilustración 9. Esquema del modo de acción de los receptores acoplados a proteína G.	132
Ilustración 10. Modelos tridimensionales del receptor NK-1R. PDB REF: 2KS9.	138
Ilustración 11. Papel y vías de señalización de la SP/NK-1R a nivel nuclear tanto en la inflamación como en la progresión, angiogénesis y migración tumoral.	143
Ilustración 12. Papel y vías de señalización de la SP/NK-1R a nivel citoplásmico tanto en la inflamación como en la progresión, angiogénesis y migración tumoral.....	144
Ilustración 13. Mecanismos de angiogénesis a través de SP/NK-1R. .	145
Ilustración 14. Vías y mecanismos de acción de la sustancia P en el cáncer.	148
Ilustración 15. Mecanismos moleculares de acción de SP/NK-1R. Tomado de Muñoz et al. J. Biosci. 40(2), June 2015, 441–463.....	148
Ilustración 16. Procesador automatizado de muestras histológicas. ...	175
Ilustración 17. Imagen del TMA de próstata.	176

Ilustración 18. Equipo automatizado para tinción inmunohistoquímica.	177
Ilustración 19. Tinción de SP. a) Flecha roja: tinción nuclear moderada de células neoplásicas. b) Flecha negra: Tinción citoplásmica difusa débil de células tumorales; flecha roja: Expresión intensa nuclear.	192
Ilustración 20. Tinción de SP. a) Flecha roja: glándulas desorganizadas, tinción citoplásmica y nuclear intermedias y nucléolos negativos de células neoplásicas. b) Flecha negra: Tinción citoplásmica difusa intermedia y nuclear intensa de células tumorales. Comparar la organización glandular de a y b..	193
Ilustración 21. Tinción de NK-1R con distribución de membrana. a) Flecha roja: Tinción débil de membrana y negativa a nivel nuclear. b) Flecha negra: nervio; Flecha naranja: invasión perineural; flecha roja: cristaloide.	194
Ilustración 22. Tinción de NK-1R. a) Flecha roja: Tinción intermedia reticular a nivel nuclear. Observar la desorganización nuclear; Flecha negra: Tinción de membrana intermedia de células neoplásicas. b) Flecha verde: Tinción citoplásmica difusa y nuclear débil-intermedia de células tumorales; Flecha morada: nervio; Flecha amarilla: Tinción débil de membrana e intensa de núcleos. Comparar el aspecto entre glándula amarilla y verde.	194
Ilustración 23. Curvas de Kaplan-Meier de SLE a 10 años. Curvas: a) afectación del margen radial (si/no). b) Puntuación de Gleason ($\leq 6/\geq 7$).	207
Ilustración 24. Curvas de Kaplan-Meier de SLE a 10 años en relación a la puntuación global (nula-débil/intensa) en la escala de Allred de expresión de SP. Curva a) a nivel nuclear de las células tumorales; y curva b) en las células estromales.	208

Ilustración 25. Curvas de Kaplan-Meier de SLE a 10 años en relación a la puntuación global (nula-débil/intensa) en la escala de Allred de expresión de NK-1R a nivel nuclear de las células tumorales 209

Ilustración 26. Distribución de la expresión de SP/NK-1R (puntuación Allred) según estado de supervivencia libre de enfermedad (Con recidiva bioquímica/ Sin recidiva bioquímica) a los 5 años de seguimiento: a) SP global a nivel del citoplasma de la célula tumoral; b) SP global a nivel del núcleo de la célula tumoral; c) SP global a nivel del citoplasma del estroma; d) NK-1R global a nivel del citoplasma de la célula tumoral; e) NK-1R global a nivel del núcleo de la célula tumoral. 211

Índice de tablas

Tabla 1. Patrones de Gleason.	46
Tabla 2. Pronóstico asociado a cada puntuación de Gleason.	46
Tabla 3. Tamaño del tumor primario anatomopatológico (pT). Modificado de Pathologic Stage Classification (pTNM, AJCC 8th Edition).	84
Tabla 4. Afectación de los ganglios regionales anatomopatológico (pN). Modificado de Pathologic Stage Classification (pTNM, AJCC 8th Edition).	85
Tabla 5. Metástasis a distancia. Categorización anatomopatológica (pM). Modificado de Pathologic Stage Classification (pTNM, AJCC 8th Edition).	85

Tabla 6. Otros hallazgos anatomopatológicos de interés. Modificado de Pathologic Stage Classification (pTNM, AJCC 8th Edition).....	85
Tabla 7. Comparativa de la incidencia entre áreas geográficas y años 2012 y 2018	90
Tabla 8. CPr. Estimaciones (x1000) sobre incidencia, mortalidad y prevalencia por regiones de la OMS en 2012. Modificado de OMS.....	95
Tabla 9. Supervivencias observadas y reletivas (%) de España en el periodo 2000-2007. Datos procedentes del ECIS European Cancer Information System (Comisión Europea) disponible: https://ecis.jrc.ec.europa.eu	98
Tabla 10. Comparativa entre las supervivencias observadas (%) de España y Europa en el periodo 2000-2007. Datos procedentes del ECIS European Cancer Information System (Comisión Europea) disponible: https://ecis.jrc.ec.europa.eu	98
Tabla 11. Características diferenciales de los neuropéptidos y neurotransmisores clásicos.....	103
Tabla 12. Clasificación de los neuropéptidos.....	108
Tabla 13. Secuencia lineal de las taquicinas.	109
Tabla 14. Diferencias entre la neurotransmisión mediante neurotransmisores clásicos y la neuropeptidérgica.....	114
Tabla 15. Resumen de datos sobre la biosíntesis de algunas de las taquicinas.	119
Tabla 16. Afinidad de las TK a los diferentes receptores NK.....	134

Tabla 17. Tipos, estructura y especificidad de los receptores de TK...	134
Tabla 18. Células que expresan NK-1R y efectos desencadenados por la unión de SP a este receptor.....	146
Tabla 19. Ventajas, beneficios y eventos adversos asociados al tratamiento con antagonistas de NK-1R.....	152
Tabla 20. Descripción de las variables cuantitativas.	189
Tabla 21. Descripción de las variables cualitativas de los pacientes analizados.....	190
Tabla 22. Valores de PSA a lo largo del periodo de seguimiento.	191
Tabla 23. Valoración de la intensidad de tinción inmunohistoquímica (Criterios de Allred) con anticuerpos anti-SP.....	195
Tabla 24. Valoración de la extensión de tinción inmunohistoquímica (Criterios de Allred) con anticuerpos anti-SP.....	196
Tabla 25. Valoración de la intensidad de tinción inmunohistoquímica (Criterios de Allred) con anticuerpos anti-NK-1R.....	196
Tabla 26, Valoración de la extensión de tinción inmunohistoquímica (Criterios de Allred) con anticuerpos anti-NK-1R,.....	197
Tabla 27. Distribución de la expresión global (Allred) de SP/NK-1R entre tejido normal y tumoral.	198
Tabla 28. Distribución de las variables según la puntuación de Gleason ($\leq 6/\geq 7$).	199

Tabla 29. Expresión (puntuación global Allred) de la SP/NK-1R en relación a la presencia de recidiva bioquímica.	200
Tabla 30. Distribución de la intensidad de SP/NK-1R con la aparición de recidiva bioquímica a lo largo del seguimiento.	200
Tabla 31. Intensidad de la inmunotinción de SP/NK-1R en citoplasma, núcleo y estroma de los adenocarcinomas de próstata.	201
Tabla 32. Expresión de Bcl-2 y p53 dependiendo la presencia de recidiva bioquímica,	202
Tabla 33. Análisis bivariante de la expresión inmunohistoquímica de SP/NK-1R y Bcl2.	203
Tabla 34. Análisis bivariante de la expresión inmunohistoquímica de SP/NK-1R y p53.	204
Tabla 35. Correlaciones bivariadas (Spearman).	205
Tabla 36. Análisis bivariante entre la aparición o no de recidiva bioquímica y la expresión global de SP/NK-1R por grupo de supervivencia libre de enfermedad (SLE) a 1, 5 y 10 años.	210
Tabla 37. Análisis bivariado de supervivencia.	212
Tabla 38. Modelos univariantes de riesgos proporcionales de Cox (cada variable constituye un modelo por separado) (supervivencia a 5 años).	213
Tabla 39. Modelos bivariantes de riesgos proporcionales de Cox (supervivencia a 5 años).	214

Tabla 40. Modelo multivariante de riesgos proporcionales de Cox (supervivencia a 5 años). 214

Tabla 41. Modelo univariante de riesgos proporcionales de Cox (cada variable constituye un modelo por separado) (supervivencia a 10 años). 215

Tabla 42. Modelos bivariantes de riesgos proporcionales de Cox (supervivencia a 10 años). 215

Tabla 43. Modelos multivariantes de riesgos proporcionales de Cox (supervivencia a 10 años). 216

Resumen

ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO SOBRE LA EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA SUSTANCIA P Y DEL RECEPTOR NK1 EN LA PRÓSTATA HUMANA NORMAL Y PATOLÓGICA.

Resumen

Introducción:

El cáncer de próstata (CPr) es, entre los hombres, el segundo cáncer más común en todo el mundo (15.0%), por detrás del cáncer de pulmón (16.7%), registrándose en 2012 alrededor de 1,1 millones de nuevos casos en todo el mundo. Además, se considera la quinta causa más común de muerte por cáncer entre los hombres.

Existen varios estudios que indican que la sustancia P (SP) y su receptor NK-1 (NK-1R) están involucrados en la progresión del cáncer. Se conoce que SP es un mitógeno universal en las células tumorales y que inhibe el proceso de apoptosis en estas células y que provoca la proliferación de células endoteliales, promueve la angiogénesis y está involucrado en la migración de células tumorales para la invasión y metástasis.

Objetivos:

- **General:** Analizar mediante técnicas inmunohistoquímicas la expresión, localización y distribución de la SP/NK-1R en la próstata humana normal y tumoral y su asociación con la progresión del CPr.
- **Específicos:** Comparar la expresión, localización y distribución de SP/NK-1R en el tejido normal y tumoral en el CPr. Analizar la asociación entre la expresión de SP/NK-1R y el riesgo de recurrencia y mortalidad asociada al CPr. Identificar los factores

(histológicos, bioquímicos y moleculares) asociados a la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global específica del CPr.

Material y método:

Población: se analizaron muestras procedentes de prostatectomías radicales vía laparoscópica realizadas entre el 01/01/2009 y el 31/12/2019 que estaban custodiadas en el archivo general de Anatomía Patológica del HSJDA. Las muestras debían estar en buen estado de conservación y sin artefactos en su procesamiento. No se seleccionaban bloques que tuvieran escasa representación tumoral (menos de un 5% del volumen de la pieza) que tras la revisión por dos patólogos es difícil de detectar tejido tumoral.

Diseño: estudio de cohortes retrospectivas mediante estudio anatómico-morfológico semicuantitativo de la expresión y distribución de la SP/NK-1R con técnicas inmunohistoquímicas y análisis de datos clínicos con seguimiento de la cohorte de casos 10 años.

Ámbito: pacientes pertenecientes al Área dependiente del Hospital San Juan de Dios del Aljarafe (Bormujos, Sevilla) (HSJDA).

Periodo de estudio: desde el momento del diagnóstico en el año 2009 hasta el 30 junio 2018 o fecha de fallecimiento.

Tamaño muestral: se calculó una muestra de 54 casos (27 de tejido normal y 27 de tejido tumoral) para detectar una diferencia de expresión de SP y NK-1R del 11.5% en el tejido normal (estroma) y del 55.7% en el tejido tumoral (nivel de confianza del 95% y potencia del 90%). Por todo ello, y teniendo en cuenta posibles pérdidas durante el procesamiento se tomó una muestra de

muestras (30 de tejido normal y 30 de tejido tumoral) procedentes de 30 pacientes prostatectomizados por CPr. Se realizó un muestreo aleatorio simple mediante una tabla de números aleatorios.

Variabes de estudio: dependientes (nivel de expresión y distribución de la SP y su receptor NK-1R, exitus, supervivencia, recidiva y metástasis) e independientes (la edad, el diagnóstico histológico, el estadio TNM, el grado de Gleason, los valores plasmáticos de PSA a lo largo del periodo de seguimiento y expresión inmunohistoquímica de los protooncogenes Bcl2 y p53, entre otras).

Fuentes de datos: las muestras biológicas proceden del archivo general de Anatomía Patológica del HSJDA. Para los datos clínicos: historia clínica digital (DIRAYA) de Atención Primaria y Especializada (Estación Clínica), TiCares (HSJDA)

Análisis estadístico: los datos se registraron en una hoja de cálculo Excel®. Una vez depurados los datos, se analizaron mediante el programa estadístico *IBM® Statistical Package for the Social Sciences* versión 22. Se hizo una exploración de los datos y se realizó el análisis estadístico descriptivo, bivalente-inferencial, multivalente mediante análisis de riesgos proporcionales de Cox y análisis de supervivencia mediante curvas de Kaplan Meier. En todos los contrastes de hipótesis se ha considerado un nivel de significación α del 5% ($p < 0,05$)

Consideraciones bioéticas: Este proyecto ha sido aprobado por el Comité de Bioética de la Investigación (CEIC) de los Hospitales Virgen Macarena-Virgen del Rocío.

Resultados:

Se analizaron 60 muestras (30 de tejido normal y 30 de tejido tumoral) procedentes de 30 pacientes intervenidos de adenocarcinoma de próstata por vía laparoscópica. La edad mediana (RIC) de los pacientes fue de 65,0 (58,0 ; 68,2) años. Durante los 10 años de seguimiento de los pacientes no se produjo ningún exitus por causas relacionadas con el adenocarcinoma de próstata ni se detectaron metástasis a distancia.

Por primera vez, se ha puesto de manifiesto la expresión de la SP/NK-1R en el CPr humano, siendo superior en el tejido tumoral que en el normal ($p=0,0005$). Los tumores con una puntuación de Gleason ≥ 7 expresan más SP (4,0 vs 4,0; $p=0,013$) y NK-1R (3,0 vs 0,0; $p=0,0005$). Los tumores que desarrollaron una recidiva bioquímica antes de los 5 o 10 años de evolución postquirúrgica presentaban mayor expresión de SP (6,0 vs 5,0; $p=0,003$) y NK-1R (4,5 vs 0,0; $p=0,0005$). La expresión de NK-1R en citoplasma es más intensa en tumores Bcl2 positivos (87,0% vs 43,2%; $p=0,001$). Los tumores p53 positivos (81,8% vs 47,4%; $p=0,013$) se asocian a niveles más altos de SP a nivel nuclear ($p=0,038$). No se ha podido demostrar la asociación de Bcl2 ó p53 con la SLE.

También se ha puesto de manifiesto por primera vez que a mayor expresión de SP a nivel nuclear de las células tumorales ($p=0,0005$) y estromales menor SLE a 5 años ($p=0,0005$); lo que también se ha demostrado cuando la expresión de NK-1R aumenta a nivel nuclear en las células neoplásicas del CPr ($p=0,002$).

Conclusiones:

Por primera vez se ha demostrado que SP/NK-1R se expresan tanto en células normales como en células tumorales del CPr, así como en las células

estromales; siendo superior en el tejido tumoral que en el normal. La expresión de SP/NK-1R en CPr se asocia a una menor SLE a 1, 5 y 10 años y por tanto con la aparición de recidivas bioquímicas. Se hacen necesarios estudios prospectivos con mayor muestra para establecer definitivamente las asociaciones arriba descritas.

Palabras clave (MeSH): Prostatic Neoplasms, Substance P, Neurokinin-1 Receptors, Recurrence, Survival, Immunohistochemistry.

Introducción

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Definición del problema

El cáncer es una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Se estima que en el año 2012 se diagnosticaron 14 millones de nuevos casos y hubo unas 8 millones de muertes relacionadas con el cáncer. Estas estimaciones corresponden a tasas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad de 182 y 102 por 100.000 personas, respectivamente (1).

El cáncer de próstata (CPr) es, entre los hombres, el segundo cáncer más común en todo el mundo (15.0%), por detrás del cáncer de pulmón (16.7%), registrándose en 2012 alrededor de 1,1 millones de nuevos casos en todo el mundo. Además, se considera la quinta causa más común de muerte por cáncer entre los hombres (1).

Existen varios estudios que indican que la sustancia P (SP) y su receptor NK-1 (NK-1R) están involucrados en la progresión del cáncer (2–5). Se conoce que SP es un mitógeno universal en las células tumorales y que inhibe el proceso de apoptosis en estas células. Se sabe que este péptido provoca la proliferación de células endoteliales, promueve la angiogénesis y está involucrado en la migración de células tumorales para la invasión y metástasis (2–4,6,7). Por todo ello, en el futuro, la vía SP/NK-1R puede significar una nueva estrategia en el tratamiento del cáncer mediante el bloqueo de la unión de la SP con su receptor (8) .

1.2 La próstata

1.2.1 Anatomía de la próstata

La próstata es una glándula del tamaño de una nuez que rodea la parte superior de la uretra masculina, justo por debajo de la salida de la vejiga. Su crecimiento y función son controlados por la acción de las hormonas masculinas. Entre sus funciones está la de producir parte de los componentes del fluido seminal. Tiene unos 3 cm de longitud, un peso de unos 20 g en el hombre adulto, por lo que es la glándula accesoria mayor del aparato reproductor masculino. Tiene un color gris rojizo, algunas veces blanquecino, y su consistencia es firme y elástica al tacto (9–11).

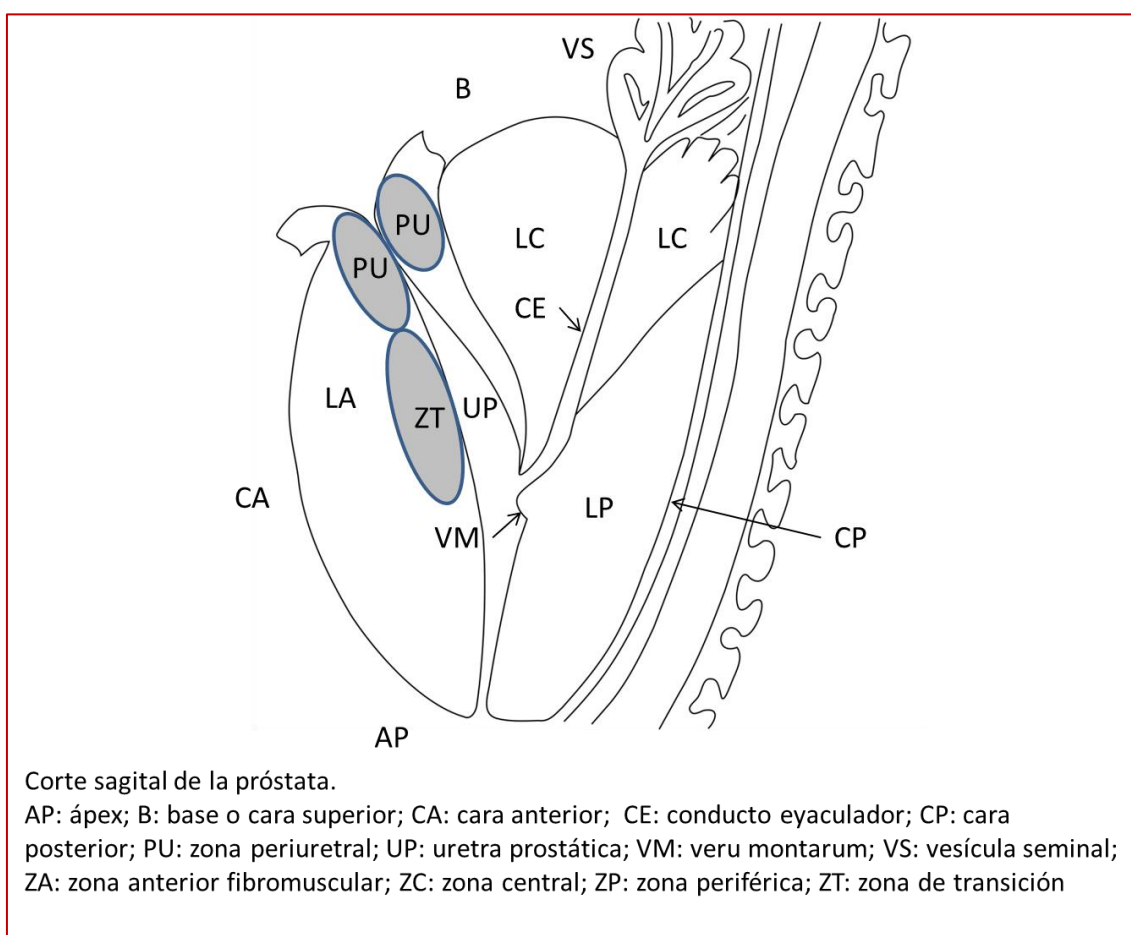
La próstata fue comparada morfológicamente por Winslow con una castaña. En realidad es de forma cónica y aplastada de delante a atrás. Su base es superior y su eje no es exactamente vertical, sino ligeramente oblicuo de arriba a abajo y de atrás a delante formando con el eje vertical un ángulo de 20 a 25 grados. Está profundamente situada en la excavación pélvica debajo de la vejiga, encima de la aponeurosis perineal media, detrás de la sínfisis púbica y delante de la ampolla rectal.

Está constituida por una porción glandular que constituye casi dos tercios del volumen de la próstata, y una porción de naturaleza fibromuscular que constituye el tercio restante. Se pueden describir en ella una cara superior, un vértice, una cara anterior, una cara posterior y dos bordes laterales (9,12,13);

- La cara anterior es corta, casi vertical (algo oblicua hacia y adelante) en relación con la sínfisis púbica pero a distancia de la misma.

- La cara posterior es alargada y abombada; ancha en la porción superior y se va estrechando progresivamente a medida que descendemos por ella. Forma un plano oblicuo de arriba abajo y de detrás hacia delante. Presenta una ligera depresión media que la recorre verticalmente en toda su longitud y la divide en dos lóbulos laterales; además produce una escotadura el límite posterior de la base que recibe el nombre de incisura prostática. Esta cara está en relación con la ampolla rectal.
- Los dos bordes laterales son anchos y redondeados; por eso, ciertos autores los consideran como caras ligeramente oblicuas hacia abajo y adentro en el sentido vertical, oblicuas hacia atrás y afuera en el sentido anteroposterior. Estos bordes se apoyan en los músculos elevadores del ano.
- La cara superior o base es la más compleja. Está en relación íntima con la vejiga, que descansa sobre ella, con las vesículas seminales y los conductos deferentes. Una vez separada de estos órganos aparece como un triángulo de ángulos muy redondeados y base posterior escotada. El ángulo anterior del triángulo está ocupado por la sección de la uretra. Por detrás de éste conducto se agrupa la masa glandular, ligeramente bilobulada. La glándula es casi por completo retrouretral. Una cresta transversal permite dividirla en tres zonas: Una vertiente anterior, en contacto con la vejiga, una vertiente posterior que está ocupada en parte por una depresión transversal y que aloja a los conductos deferentes, las vesículas seminales y los vasos sanguíneos y, por último, un lóbulo medio.

- El vértice o pico prostático está truncado y centrado por la uretra que emerge de la glándula en ese punto, convirtiéndose a partir de entonces en membranosa. El vértice prostático descansa sobre la aponeurosis perineal media.



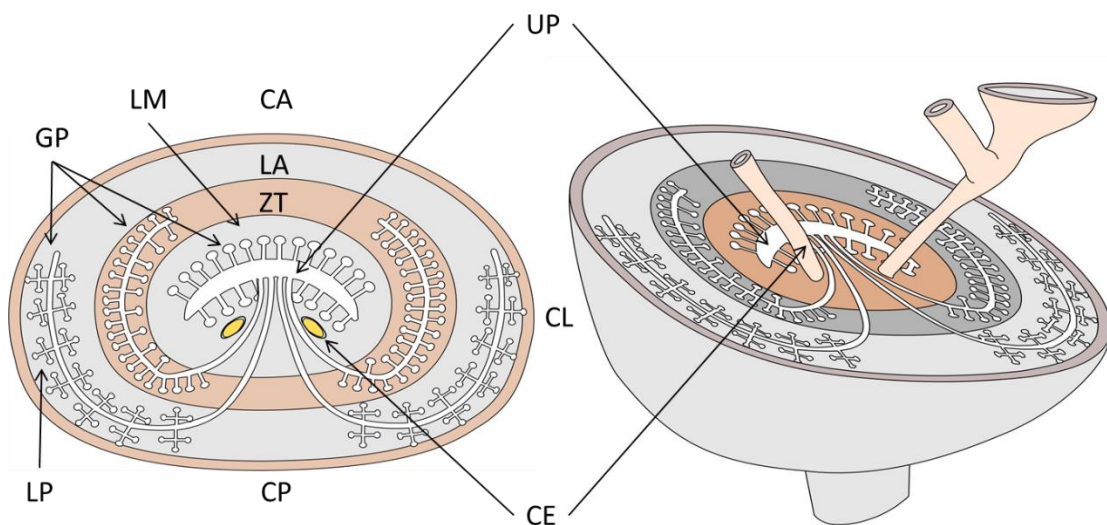
Corte sagital de la próstata.

AP: ápex; B: base o cara superior; CA: cara anterior; CE: conducto eyaculador; CP: cara posterior; PU: zona periuretral; UP: uretra prostática; VM: veru montarum; VS: vesícula seminal; ZA: zona anterior fibromuscular; ZC: zona central; ZP: zona periférica; ZT: zona de transición

Ilustración 1. Corte axial de la próstata humana para ilustrar su estructura y relaciones.

Aunque no se distinguen de manera clara, tradicionalmente se han descrito los siguientes lóbulos en la próstata (14):

- Un lóbulo anterior o istmo que se sitúa delante de la uretra. Tiene una composición fibromuscular. Las fibras musculares representan la prolongación superior del músculo esfínter de la uretra. Éste lóbulo contiene muy poco o ningún tejido glandular.
- Un lóbulo posterior que se sitúa detrás de la uretra y de los conductos eyaculadores. Se palpa fácilmente con tacto rectal.
- Dos lóbulos laterales que se sitúan a cada lado de la uretra y constituyen la mayor porción del volumen de la próstata.
- Un lóbulo medio que se sitúa entre la uretra y los conductos eyaculadores y se relaciona estrechamente con el cuello de la vejiga.



Corte sagital y axial de la próstata.

CA: cara anterior; CE: conducto eyaculador; CL: cara lateral; CP: cara posterior; GP: glándulas prostáticas; LA: lóbulo anterior; LM: lóbulo medio; LP: lóbulo posterior; UP: uretra prostática; ZT: zona de transición.

Ilustración 2. Corte axial y sagital de la próstata humana y los conductos eyaculadores. Modificado de Kierszenbaum y Tres, 2012.

Usando modelos tridimensionales, en 1981, McNeal (14) puso de manifiesto la complejidad estructural de la próstata y sus relaciones. Según este autor en la próstata se describen cuatro regiones anatómicas. Cada una de ellas guarda una relación específica con un punto de referencia anatómico central, la uretra.

- Zona de transición: está constituida por dos lóbulos que rodean el segmento proximal de la uretra prostática, en posición anteromedial respecto a la zona periférica. En condiciones normales, sólo constituye el 5% de la masa glandular prostática. En ella asientan la mayoría de las hiperplasias benignas de próstata (HBP).
- Zona central: se sitúa en la porción supero-posterior del segmento proximal de la uretra rodeando a los conductos eyaculadores. Constituye la mayor parte de la base de la próstata y en torno al 20% de la masa glandular.
- Zona periférica: rodea a la zona central por detrás, lateralmente y por debajo. Comprende el 70% de la masa glandular. Es en esta zona donde asientan la mayoría de los adenocarcinomas de próstata, seguida a distancia de la zona de transición y de forma esporádica, en el resto de la próstata. En ella no suelen asentar las HBP.
- Zona del estroma fibromuscular anterior: se continúa por la parte superior con la cara anterior del cuello vesical y por la inferior con el esfínter estriado externo. Esta zona carece de componente glandular.
- Zona periuretral: está limitada alrededor del segmento proximal de la uretra y al colículo seminal. Está constituida por glándulas atróficas

situadas en el interior del esfínter liso. Constituye menos del 1% de la masa glandular total.

Por motivos de simplificación, la anatomía zonal de la próstata descrita por McNeal puede agruparse en dos zonas: una zona interna constituida principalmente por la zona de transición y una zona externa, constituida por la zona periférica y la central. La clasificación propuesta por McNeal y su versión simplificada son pertinentes debido a la distribución topográfica preferente de cada patología de la próstata; siendo la zona periférica más propensa a los procesos inflamatorios y, suele ser el origen de la mayor parte de los adenocarcinomas de próstata; los otros carcinomas proceden de la zona de transición y suelen ser en su mayoría tumores descubiertos de forma fortuita. Mientras, la zona central es respetada por los procesos inflamatorios; y los carcinomas sólo se observan en ella por extensión a la vecindad. La zona de transición y la periuretral son los sitios predilectos para el asiento de las HBP (12,14–16).

1.2.1.1 Relaciones anatómicas de la próstata

La próstata se sitúa en la encrucijada urogenital, alrededor de la uretra y de los conductos eyaculadores que la atraviesan. Se halla, pues, en relación íntima con el aparato esfinteriano uretrovesical. Alrededor de la próstata, el tejido celular pélvico se aplasta en láminas más o menos densas llamadas aponeurosis pélvicas, que la limitan y la aíslan de las paredes y de las vísceras que ocupan la pelvis menor constituyendo un verdadero compartimento. Por mediación de las paredes de éste compartimento, entra en relación con las paredes y los órganos pélvicos (9).

1.2.1.1.1 **Relaciones intrínsecas**

La próstata forma prácticamente un mismo cuerpo con otras estructuras del aparato urogenital como son: la uretra prostática, el aparato esfinteriano uretrovesical, el utrículo prostático y los conductos eyaculadores.

- Uretra prostática. La uretra desde su origen a nivel del cuello cervical hasta el punto en que inicia su recorrido a través de la aponeurosis media, está en relación con la próstata. La uretra prostática atraviesa esta glándula de arriba abajo desde la parte más anterior de su base hasta la parte posterior del vértice. La uretra prostática tiene de 2,5 a 3 cm de longitud y un diámetro de 1,1 a 1,5 cm. Describe una curva de concavidad anterior. En la unión del tercio superior con el tercio medio, aparece una dilatación en la luz uretral llamada seno prostático. A nivel de la pared posterior, aparece una angulación conocida como curva de Merckel o ángulo de Dixon. En la abertura de éste ángulo se encuentra una eminencia músculo-eréctil llamada verumontanum, colliculus seminalis o caput gallinaginis. En su polo superior, se forman dos crestas conocidas como frenillos del veru, que se pierden divergiendo en el labio posterior del cuello vesical, limitando entre sí una ligera depresión llamada fosita prostática. En ésta, se abren numerosos orificios glandulares puntiformes donde vierten su contenido los acinos del grupo subcervical de la glándula prostática. A cada lado del relieve del veru la pared posterior de la uretra se deprime para formar el canal lateromontanal. En él, se abren algunos orificios glandulares prostáticos posteriores y laterales. Los orificios de las otras glándulas se abren en las paredes anteriores y laterales. Con este

tramo de la uretra se relacionan las siguientes estructuras: los esfínteres liso y estriado, la cavidad diverticular, el utrículo prostático y los dos conductos eyaculadores (9).

- Los conductos prostáticos (de 20 a 30) se abren principalmente a los surcos –senos prostáticos- situados a cada lado del colículo seminal en la pared posterior de la uretra prostática. A través de ellos, se conduce hacia la uretra el líquido prostático, una secreción lechosa y fina que aporta cerca del 20% del volumen del líquido seminal. Éste último está compuesto por una mezcla de las secreciones producidas por los testículos, las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales (9,10).
- Esfínter liso. Este anillo muscular rodea el origen de la uretra prostática sustituyendo su deficiente musculatura circular. Sólo la parte posterior de éste anillo está en relación con la próstata (9).
- Esfínter estriado (esfínter externo de la uretra). Alrededor de la uretra membranosa y del vértice prostático persiste un anillo muscular, reliquia de la disposición primitiva de éste aparato muscular. Más arriba, las fibras circulares están interrumpidas en la cara posterior de la glándula. Mientras el esfínter liso de la uretra presenta oposición de manera constante por su tono a la salida de la orina y al reflujo del líquido espermático hacia la vejiga, el esfínter estriado constituye el órgano de oclusión vesical voluntaria y se relaciona con la expresión de las glándulas prostáticas por su contracción en el momento de la eyaculación (9).

- Conductos eyaculadores. Son conductos de 2,5 cm de longitud que discurren oblicuamente hacia abajo y adelante aproximándose ligeramente uno al otro y limitan por detrás la comisura preespermática de la próstata. Están separados por el utrículo prostático y terminan en el verumontanum a uno y otro lado de la hendidura utricular en el llamado seno prostático (9,10).

1.2.1.1.2 **Compartimento prostático**

La condensación del tejido pélvico alrededor de la próstata la aísla en un compartimento por mediación del cual se establecen las relaciones con las formaciones circundantes. A éste compartimento se le denomina erróneamente cápsula prostática (9,10).

El estroma conjuntivo-muscular forma alrededor de la glándula varias capas concéntricas denominadas cáscara o zona de Retzius. En el espesor de ésta cáscara, se alojan multitud de venas anastomosadas en plexos formando una especie de sistema cavernoso al que drenan las venas prostáticas y la mayoría de las venas vesicales. En la cara profunda de la zona de Retzius, se originan una serie de tabiques que se dirigen hacia el centro del órgano circunscribiendo cierto número de compartimentos en los que se acumulan los acinos glandulares (9).

El fondo del compartimento prostático está formado por el plano perineal en la separación que media entre los fascículos internos de los elevadores. A éste plano se le denomina suelo o diafragma urogenital y se extiende entre las dos ramas isquio-pubianas. Está formado por tres formaciones transversales que se suceden de delante atrás: el ligamento *arquatum*, el ligamento transversal de

Henle y la aponeurosis perineal media. Entre el ligamento de Henle y la aponeurosis media se abre un hiato por el que la uretra abandona la cavidad pélvica y sobre el que descansa el vértice prostático. El ligamento de Henle y la aponeurosis media forman el suelo del compartimento prostático (9).

La pared anterior del compartimento prostático está delimitada por una delgada hoja que se pierde en contacto con el cuello vesical y que recibe el nombre de lámina preprostática, hoja isquio-pre-uretro-prostática de Farabeuf o lámina de Zuckerkandl. Esta hoja parece continuarse más allá del cuello con la aponeurosis pre-vesical y parece tener relación con la vaina vascular de los vasos vesicales anteriores (9).

Por detrás, el compartimento prostático está cerrado por la aponeurosis prostatoperitoneal de Denonvilliers. Ésta lámina cuadrilátera de tejido músculo-conjuntivo denso tiene de 2 a 3 mm de espesor y se eleva por encima de la aponeurosis perineal media. Se extiende entre la aponeurosis latero-prostática, entre ambos elevadores y separa la próstata del recto. Más allá de la base prostática, se desdobra para envainar las vesículas seminales y la parte terminal de los conductos deferentes. Acaba en el fondo de saco peritoneal vésico-rectal de Douglas (9).

Lateralmente la próstata está sostenida por dos hojas sagitales que partiendo por detrás de la cara anterior del sacro, siguen las caras laterales del recto, posteriormente las de la próstata para terminar en la cara posterior de las sínfisis del pubis. A estas láminas se les denomina sacro-recto-génito-púbicas. Son bastante gruesas y se disponen en sentido vertical, ligeramente inclinadas hacia abajo y adentro. Están constituidas por tejido conjuntivo fibromuscular, se

adhieren a la glándula y contienen las venas periprostáticas. Estas láminas latero-prostáticas forman parte del aparato de suspensión de las vísceras pélvicas (9,10).

Por la parte de arriba el compartimento prostático no tiene pared propia comunicando directamente con el compartimento vesical. La vejiga descansa en él y lo cierra. Entre la próstata y las paredes de su compartimento existe una vaina de tejido celular periprostático localizado preferentemente en la parte posterior y lateral (9,10).

1.2.1.1.3 Relaciones extrínsecas

1.2.1.1.3.1 Relaciones anteriores

La cara anterior de la próstata, cubierta por el esfínter externo de la uretra, luego por la hojilla preprostática, se relaciona con la sínfisis del pubis pero a una distancia de entre 2 y 3 cm. El espacio entre la glándula y la sínfisis se conoce como compartimento preprostático que queda limitado: por delante por la sínfisis, por detrás por la hoja preprostática, por arriba por los ligamentos pubovesicales, por donde comunica con el espacio de Retzius y la cara anteroinferior de la vejiga, por abajo por el ligamento *arquatum* y por el ligamento transverso de la pelvis, y lateralmente por los fascículos internos de los elevadores (9,10).

Este compartimento contiene vasos en un tejido celular adiposo más o menos denso sobretodo destaca el rico plexo venoso de Santorini que conecta por una parte con las venas prevesicales y vesicales inferiores y, por otra con las venas pudendas internas, que proceden de la bifurcación de la vena dorsal del pene. También contiene arterias de poca importancia, ramas de la pudenda

interna que avanzan por el espesor de la pared anterior del diafragma urogenital antes de convertirse en arteria dorsal del pene. También se encuentran las arterias vesicales anteriores ascendentes y una arteria adiposa, todas ramas de la pudenda; y algunos ramos retro-sinfisarios originados en las arterias obturadoras y pequeñas arterias derivadas de las transversales suprapúbicas subsidiaria de la arteria epigástrica. Este espacio anterior constituye una vía quirúrgica clásica descrita originalmente por Terencio Millín (9,10).

1.2.1.1.3.2 Relaciones laterales

Los bordes laterales de la próstata mediante las láminas latero-prostáticas se apoyan en los fascículos internos de los músculos elevadores del ano. Por fuera y por debajo del cual se localiza la fosa isquio-rectal. Entre la glándula y la aponeurosis latero-prostática, se sitúan los importantes plexos venosos latero-prostáticos. En este punto la excavación pélvica es muy estrecha y la glándula queda empotrada entre las paredes y las partes blandas que tapizan éstas (9,10).

1.2.1.1.3.3 Relaciones posteriores

Por la cara posterior, la próstata tiene una relación íntima con la cara anterior de la ampolla rectal. El recto se sitúa bajo la vejiga y la próstata formando una especie de casquete sub y retro-prostático. Tanto la próstata como este segmento del tubo digestivo, están separados por la aponeurosis de Denonvilliers. Entre la aponeurosis y la glándula se encuentra el espacio desplegable retro-prostático de Proust y Gosset, ocupado por un tejido celular interpuesto entre la glándula y la vaina celulosa peri-prostática. Igualmente, entre

la aponeurosis y la cara anterior del recto, se sitúa el tejido celular pre-rectal conocido por los anatomistas como espacio desplegable de Quénu y Hartmann. Gracias a esta relación podemos explorar la cara posterior de la glándula mediante el tacto rectal (9,10).

1.2.1.1.3.4 Relaciones inferiores

El vértice de la próstata se relaciona con el perineo situándose en contacto con el diafragma urogenital que perfora la uretra membranosa y se insinúa entre el ligamento transversal de la pelvis de Henle y la aponeurosis media. Esta aponeurosis comprende dos planos fibrosos que envainan una lámina muscular formada por los dos músculos transversos profundos (derecho e izquierdo) que quedan separados en la línea media por el rafe fibroso recto-uretral conocido como nudo fibroso del perineo de Mercier. A este rafe viene a confluir: por detrás las fibras del esfínter anal, por delante las fibras del músculo bulbo-cavernoso y lateralmente el músculo transversal superficial. Esta vía ha sido utilizada clásicamente como acceso para la prostatectomía perineal descrita por Proust (9,10).

1.2.1.1.3.5 Relaciones superiores

Tienen un interés quirúrgico en la actualidad.

La base de la próstata está dividida por una cresta transversal en dos vertientes. La vertiente posterior por la que mantiene relación con órganos genitales y la vertiente anterior que la relacionan con la vejiga.

Vertiente posterior. En éste punto presenta la depresión hiliar ocupada por el vértice de las dos vesículas seminales y la terminación de los conductos

deferentes. Las vesículas seminales divergen ascendiendo aplicadas contra la pared posterior de la vejiga y junto con los conductos deferentes, están inmersas en un tejido celular denso, que forma parte de la aponeurosis de Denonvilliers y las fibras del músculo interseminal de Delbet que contribuye a la evacuación del contenido de estos órganos. El fondo de saco peritoneal recto-vesical, recubre el fondo de las vesículas y puede descender hasta 15 o 20 mm por debajo de la base prostática, generalmente cuando la vejiga está vacía, pudiendo en este momento, casi contactar con la glándula (9).

Vertiente anterior. Sobre ella descansa la vejiga, entre la uretra y la cresta transversal de la base de la próstata, a partir de este punto ambos órganos pierden el contacto. Por tanto, la vejiga corresponde a la parte pre-espermática de la próstata definida arriba como lóbulo medio. La vejiga descansa por la mitad anterior del triángulo de Lieutaud. Cuando se desarrolla una hipertrofia prostática, se observa de la prominencia de este órgano en la parte posterior del triángulo (9).

Por delante, en el cuello vesical las relaciones son íntimas por continuidad de la musculatura cervical y uretral (10).

1.2.1.2 Irrigación arterial de la próstata

Las arterias de la próstata son poco voluminosas. Proceden de tres orígenes: de la arteria hemorroidal media, de la arteria pudenda interna y de la génito-vesical (rama de la hipogástrica). La arteria génito-vesical abandona la pared pélvica dirigiéndose abajo y adentro hacia la base de la vejiga. Antes de llegar a ella se divide en la rama vesículo-deferencial y la rama vésico-prostática. La arteria vésico-prostática se desdobra en la arteria vesical inferior -que a su vez da algunas ramas para la base de la próstata- y la arteria prostática. De la

arteria hemorroidal media y de la pudenda interna nacen una serie de ramas accesorias que nutren la región póstero-lateral de la glándula. La arteria prostática, suministra el hilio y desciende por los lados de la glándula junto a las aponeurosis laterales con grandes venas satélites terminando del vértice prostático. De esta arteria se desprenden una serie de ramas por las caras laterales de la glándula algunos de los cuales se insinúa entre la base de la próstata y la vejiga. De estas ramas nacen bifurcaciones que penetran en el parénquima glandular siguiendo los tabiques que lo fragmentan. La cara posterior de la próstata es pobre en vascularización a diferencia de las caras laterales (9,10).

1.2.1.3 Drenaje venoso y linfático de la próstata

Las venas prostáticas se unen para formar un plexo a los lados y en la base de la próstata. Este plexo venoso prostático se sitúa entre la cápsula venosa de la próstata y la vaina prostática y drena a las venas ilíacas internas. El plexo venoso prostático se continúa en la parte superior con el plexo venoso vesical y en la posterior con el plexo venoso vertebral interno. Algunas venas pre-prostáticas desembocan en el plexo venoso de Santorini y otras confluyen a las venas vesicales inferiores. Las venas de los plexos latero-glandulares se unen con las venas vesículo-deferenciales constituyendo junto a las vesicales la vena génito-vesical de Farabeuf que, a su vez, desemboca en la vena hipogástrica (9).

Los ganglios linfáticos de la próstata ya fueron descritos por Seppay en 1.845. Nacen alrededor de las paredes de los fondos de saco glandulares (plexos periacinosos). Desde aquí, se dirige a la superficie exterior del órgano formando

la red peri-prostática más desarrollada en la cara posterior. Esta red termina en una red de vasos colectores procedentes de la submucosa de la uretra prostática y de los conductos eyaculadores. Entre las dos vesículas seminales, se sitúan los linfáticos ascendentes que cruzan a la arteria umbilical para terminar en los ganglios linfáticos de la cadena iliaca externa, en conexión con los linfáticos de las vesículas y de la base de la vejiga. De la cara posterior de la próstata aparecen una serie de vasos laterales que se dirigen hacia afuera y hacia atrás para desembocar en los ganglios vesicales laterales y en los ganglios hipogástricos medios, en los que podemos encontrar 2 ó 3 pequeños nódulos ganglionares. Estos linfáticos laterales son satélites de la arteria prostática. El tercer grupo de linfáticos deferentes lo constituye el grupo posterior. Éste está en relación con los linfáticos del recto que siguiendo las aponeurosis sacro-recto-génito-púbicas, terminan en los ganglios sacro-laterales llegando incluso hasta los ganglios situados en el promontorio que quedan por debajo de la bifurcación aortica. Westhues describió una corriente linfática que llegaría a la encrucijada hemorroidal en la pared rectal. Se han descrito igualmente, linfáticos anteriores, que son poco numerosos y delgados. Éstos van desde la cara anterior de la próstata hacia los ganglios prevesicales. Igualmente, se han descrito algunos linfáticos descendentes, satélites de la arteria pudenda interna, que se unen a linfáticos de la uretra membranosa para llegar a un ganglio de la cadena hipogástrica (9).

1.2.1.4 Inervación de la próstata

Los nervios prostáticos emanan del ganglio hipogástrico. Avanzan al lado de las arterias y presentan un cierto número de ganglios minúsculos descritos

por Müller y Reinert. Unos nervios tienen función sensitiva y secretora y se dirigen hacia los elementos glandulares; otros, son nervios motores y están destinados a las fibras musculares del estroma y de los vasos. Se han descrito ramas nerviosas originadas en el tercer y cuarto par sacro que siguen las aponeurosis sacro-recto-génito-púbicas para llegar hasta la glándula. Algunos de estos nervios se mezclan con las fibras originadas en los plexos hipogástricos mientras que otras quedan aisladas. Estos nervios, de diferente origen, forman un plexo periprostático antes de terminar en la glándula formando, bien extremos libres o bien una serie de corpúsculos terminales.

En resumen, las fibras parasimpáticas nacen en los nervios espláncnicos de la pelvis (S2 a S4) y las simpáticas en el plexo hipogástrico inferior (9).

1.2.2 Embriología

La próstata aparece tempranamente durante el desarrollo embrionario, como una condensación del mesénquima a lo largo del trayecto pélvico de la uretra. Alrededor de la novena semana del desarrollo embrionario, la próstata tiene la apariencia y localización propia del adulto (17,18).

Asociado al desarrollo del sistema de conductos genitales masculinos (el conducto deferente y la uretra), se produce la formación de las glándulas sexuales accesorias masculinas, las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales. Estas glándulas se originan como evaginaciones epiteliales de los sistemas de conductos a los que están asociados (las vesículas seminales proceden de los conductos deferentes y las demás del seno urogenital que es el precursor de la uretra). Durante su formación se producen interacciones epitelio-mesénquima similares a las que ocurren durante la fase de

desarrollo de otras glándulas (14). El mesénquima se condensa más a lo largo de la cara posterior de la uretra y en la región del ápex. En la región media, el mesénquima altamente condensado está en relación directa con la hilera del epitelio columnar alto. Entre su punto medio y el cuello de la vejiga, el segmento proximal de la uretra forma un ángulo agudo de vértice anterior. Los conductos eyaculadores penetran en el mesénquima a través del que será verumontanum que se localiza a nivel del punto medio de la uretra. Estos túbulos tienen su origen en los conductos de Wolff, mientras que el estroma, que es indistinguible del mesénquima prostático, procede principalmente del seno urogenital. Sin embargo, ésta proporción del mesénquima, que rodea a los conductos eyaculadores y que se expande proximalmente hasta ocupar completamente la base de la próstata, se constituye en el adulto como un área diferenciada que se conoce como zona central y, probablemente tenga igualmente su origen en los conductos de Wolff, como las vesículas seminales. En conclusión, la próstata tiene un doble origen embriológico (17,18).

Alrededor de la décima semana de gestación, las yemas epiteliales empiezan a ramificarse especialmente en dirección posterior y lateral desde la cara posterior y probablemente desde la cara lateral de la pared del segmento distal de la uretra hacia el mesénquima condensado. Recientes reconstrucciones computarizadas de especímenes prostáticos cortados de forma seriada han mostrado que los patrones de ramificación que se establecen en estos estadios iniciales del desarrollo son idénticos a los que se descubren en la próstata adulta (17,18).

El programa de desarrollo embrionario se activa por los andrógenos secretados por el testículo fetal. El tamaño de la próstata en el neonato es menor de un centímetro de diámetro y está determinado por un número programado de divisiones de las células estromales, después del cual el estroma deja de tener un efecto inductor sobre el proceso de ramificación del sistema ductal. Específicamente, las células mesenquimales desarrollan receptores para los andrógenos que parecen ser el objetivo principal de los andrógenos circulantes. En esta fase del desarrollo, las células epiteliales no tienen receptores de andrógenos. Una vez activadas por la dihidrotestosterona (DHT), las células mesenquimales actúan sobre las células epiteliales mediante la secreción paracrina de factores de crecimiento (FGF-10 y TGF- β_1) que inducen la formación de glándulas, regulando la producción de *Sonic hedgehog* (Shh) (17,18). Mediante este mecanismo, el mesénquima urogenital induce la formación de evaginaciones a partir del endodermo del seno urogenital, justo por debajo de la vejiga urinaria que van ramificándose progresivamente. El grado de gemación depende de la acción inhibidora de BMP-4, que se expresa con mayor intensidad en el área lateral de la región donde se han empezado a ramificar los conductos prostáticos. En la base de todas estas interacciones a nivel molecular encontramos dos factores de transcripción: el Hoxa-13 y el Hoxd-13 que parecen determinar que el órgano que se va a formar en esa zona sea la próstata. Se ha comprobado que los mutantes homocigotos negativos para estos genes Hox desarrollan un número reducido de conductos prostáticos. El epitelio prostático en desarrollo induce a mesénquima que lo rodea para que se diferencie hacia células musculares lisas. Se han desarrollado experimentos de recombinación tisular en los que se demuestra que si combinamos mesodermo de ratones con

síndrome de feminización testicular, en los que no existen receptores de testosterona, y epitelio normal no se produce diferenciación epitelial, mientras que si combinamos mesodermo normal, presenta los receptores de testosterona, con epitelio derivado de ratones con síndrome de feminización testicular, el desarrollo y diferenciación del epitelio es normal. Luego, la diana de las hormonas androgénicas es el componente mesodérmico del primordio glandular. Durante la fase de desarrollo, los tejidos que rodean al seno urogenital sintetizan 5-reductasa que convierte la testosterona en DHT. Mediante la activación de los receptores apropiados para cada tipo de testosterona, los tejidos fundamentales del aparato reproductor masculino se mantendrán y crecerán (17,18).

Hasta la pubertad, la próstata no estará expuesta nuevamente a una estimulación hormonal. Entonces, la próstata crecerá a un ritmo lento alcanzando un tamaño algo inferior a los dos centímetros de diámetro. Durante éste período, tanto los conductos como los acinos están revestidos por un epitelio que ha sufrido pequeños cambios desde la etapa neonatal. Los espacios glandulares están tapizados por un conjunto de células multiestratificadas de núcleos oscuros. Superficialmente, se asemeja a la atrofia postinflamatoria en el adulto aunque histológicamente son diferentes. La aceleración del crecimiento y el proceso de maduración de la glándula parecen concluir alrededor de los veinte años de edad (17,18).

1.2.3 Evolución postnatal de la próstata

El volumen de la próstata varía mucho según las edades. Rudimentaria en el niño, en el que aparece como una herradura aplicada a la parte posterior de la uretra, crece bruscamente en la pubertad como las demás formaciones

genitales, alcanza su desarrollo completo entre los 20 a 25 años de edad y a partir de ese momento, parece quedar estacionaria hasta los 40 o 50 años.

Cuando alcanza en el adulto su desarrollo completo, mide por término medio 4,5 centímetros de ancho, 3,5 a 4 centímetros de longitud y 3 centímetros de grosor. Su peso es de 20 a 25 g. Alrededor de los cincuenta años de edad, en la mayoría de los hombres, se produce un nuevo crecimiento focal en forma de hiperplasia nodular benigna (HBP). Éste proceso incrementa predominantemente el grosor de la glándula, y menor medida su longitud. En las HBP masivas, la glándula prostática se vuelve casi esférica alcanzando diámetros iguales o superiores a los 6 cm. Las disecciones de la HBP muestran aumento del tamaño de una pequeña región de la glándula. De hecho, una vez eliminada la región hiperplásica, el volumen medio de la próstata restante se mantiene constante hasta los 70 años o más. Aunque se ha comprobado que el resto de la glándula normal (no HBP) más que atrofiarse, puede continuar creciendo hasta la senectud (9,17,19).

1.2.4 Histología

1.2.4.1 Clínica e histología de la próstata normal

La próstata es la mayor glándula genital accesoria y está rodeada por una cápsula. La próstata humana es un órgano compuesto por elementos glandulares y no glandulares. Ambos elementos están tan estrechamente unidos que es casi imposible su disección macroscópica. El componente no glandular de la próstata se concentra en la región anteromedial, siendo responsable de la convexidad anterior del órgano. El contorno glandular de la próstata se asemeja

a un disco con alas laterales que envuelven parcialmente la región anterior constituida por el tejido no glandular.

La porción glandular comprende entre 30 y 50 glándulas túbulo-alveolares ramificadas que vacían su contenido en la uretra protática a través de unos conductos excretores largos. Las glándulas prostáticas se agrupan en tres regiones, aunque algunos autores hablan de cuatro, creciendo cada una de un segmento distinto de la uretra prostática. En líneas generales distinguimos: 1) una zona central con glándulas mucosas periuretrales, 2) una zona de transición con glándulas submucosas periuretrales y 3) una zona periférica con glándulas ramificadas (compuestas); es en esta última zona donde se generan hasta el 70-80% de los adenocarcinomas de próstata (20).

La próstata madura está compuesta por glándulas túbulo-alveolares dispuestas en lóbulos rodeados de estroma muscular liso. El epitelio de las glándulas está constituido por células secretoras que se apoyan sobre una capa de células basales. Se trata de un epitelio cilíndrico simple o pseudoestratificado cuyos núcleos se sitúan en la porción basal y sus citoplasmas son de aspecto claro. Las células secretoras forman una capa continua alrededor de las luces glandulares y se apoyan sobre la lámina propia. Las células glandulares tienen muy desarrollados tanto el retículo endoplásmico liso como el aparato de Golgi (20–23). Estas células producen el antígeno protático específico, la fosfatasa ácida prostática específica (PAP) y son ricas en citoqueratinas (CK) de bajo peso molecular CK8 y CK18, detectables mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHQ).

Las células basales forman una capa discontinua por fuera de las células secretoras. El eje mayor de sus citoplasmas y núcleos se dispone paralelo a la membrana basal y por tanto a 90 grados del eje mayor de las células secretoras. El citoplasma de estas células es poco visible y sus núcleos son muy alargados. Mediante técnicas IHQ se puede poner de manifiesto la presencia característica en estas células de citoqueratinas de alto peso molecular (CK5 y CK14) y a nivel nuclear de p63. Estas células basales no producen PSA. En el epitelio normal, estas células basales están menos diferenciadas que las células secretoras y parecen ser las encargadas de la renovación de estas últimas mediante división celular, por lo que se trata de un grupo de células madre con capacidad de autorrenovarse y dividirse y diferenciarse para mantener el número de células secretoras (20,21,23).

A parte de las células secretoras y las basales se detectan una serie de células de estirpe neuroendocrina que constituyen un número minoritario de células que se disponen de forma dispersa en el epitelio glandular prostático y que expresan positividad mediante IHQ a cromogranina-A y/o sinaptofisina (20,21,23).

La luz glandular está ocupada por la secreción prostática que en ocasiones forma estructuras amorfas y densas conocidas como cuerpos amiláceos (especialmente en personas mayores), que son ricos en glucoproteínas. En algunas ocasiones, contienen depósitos de calcio y en otras ocasiones unas estructuras alargadas, poliédricas, más o menos afiladas, llamadas cristaloides. Estos cristaloides suelen aparecer en los adenocarcinomas de próstata (20,21,23).

Las células estromales son ricas en la enzima 5 α -reductasa por lo que son la fuente principal de dihidrotestosterona (DHT) para las células epiteliales adyacentes. La DHT se une a los receptores de andrógenos del citosol y del núcleo y estimula la producción de factores de crecimiento mitógenos que inducen la proliferación de las células epiteliales y estromales prostáticas. Los inhibidores de 5 α -reductasa se utilizan en el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata ya que al reducir la síntesis de DHT, disminuyen la hiperplasia nodular periuretral y por tanto los síntomas urinarios (20,21,23).

El líquido producido por la próstata forma en torno al 30-50% del volumen del líquido seminal, y es rico en ácido cítrico, cinc y enzimas proteolíticas. Tiene un pH alcalino ya que una de sus finalidades es neutralizar el pH ácido vaginal. A parte de ésta tiene otras funciones como: transportar y aportar nutrientes a los espermatozoides y licuar el semen una vez se encuentra en el interior de la vagina. Entre los componentes proteicos del líquido prostático destacan: la fosfatasa ácida específica de la próstata, la amilasa, la fibrinolisisina, y el antígeno prostático específico (PSA), que es un marcador serológico que se utiliza, no sin controversias, para la detección precoz del CPr.

Alves et al. analizaron la estructura histológica de las distintas zonas de la próstata. En su estudio, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el contenido de las fibras de colágeno entre la zona central y la zona posterior (24). Esta similitud encontrada en el citado estudio es característica de las dos zonas donde se desarrolla con mayor frecuencia el CPr (25–27). En contraste, la zona de transición tenía diferencias estadísticamente significativas con la zona posterior. Se obtuvieron resultados similares en otros

estudios, como las investigaciones de Amin et al. (28), que analizaron el componente de colágeno en las tres regiones, y Chagas et al. (29), quienes analizaron el colágeno sólo en la zona de transición.

Otro de los componentes del tejido no glandular es la fibra muscular que fue motivo de atención del estudio de Leimgruber et al. (30). Según estos autores, las fibras musculares están fuertemente involucradas en el desarrollo y la progresión de la HBP y del CPr. En la HBP, se ha puesto de manifiesto un aumento en las fibras musculares lisas. Este fenómeno es probablemente atribuible a la proliferación y mio-diferenciación de las células estromales. En el CPr, estas células disminuyen significativamente, transformándose en fibroblastos y miofibroblastos, que juegan un papel fundamental en la progresión del CPr (30,31). En este sentido, Zhang et al. sugirieron que el CPr ocurre con mayor frecuencia en áreas en las que las fibras musculares lisas se disponen de forma más dispersa (31), y encontraron que el porcentaje más bajo de fibras musculares estaba en la zona posterior que es la región con la mayor incidencia de CPr (24,31).

Sólo unos pocos estudios han analizado el papel de las fibras elásticas y sus receptores en la BPH y en la invasión tumoral del CPr (32,33). La desorganización de las fibras elásticas intratumorales en el estroma del CPr fue previamente publicado por McNeal et al. y Krušlin et al. (21,34). Alves et al. encontraron que la zona de transición contenía el mayor número de fibras elásticas que podían haber sido secretadas por las células musculares, que también eran más numerosas en esta región que en otras regiones. El estudio de Alves et al. mostró una diferencia estadísticamente significativa en la

distribución y arquitectura de las fibras elásticas entre la zona central y la zona posterior (24).

Powell et al. (32) observaron menos inervación de la zona de transición que en la zona posterior, por lo que postularon que este aumento en la densidad de fibras nerviosas de la zona posterior podía estar involucrado en la carcinogénesis.

Con respecto a la altura epitelial, la zona central y la zona posterior mostraron las mismas características. Debido a que estas zonas son morfológicamente similares, ambas regiones presentan las mismas condiciones para el desarrollo del CPr (24).

1.2.4.2 Clínica e histología de la hiperplasia benigna de la próstata

La hiperplasia prostática benigna (HBP) se inicia alrededor de los 45 años de edad y consiste en un aumento (benigno) del tamaño de la próstata. En algunos casos genera una dificultad al flujo urinario con compresión extrínseca de la uretra prostática (23).

Las glándulas prostáticas mucosas de la zona central y las submucosas de la zona de transición (ambas situadas a nivel periuretral) y el estroma circundante sufren una hiperplasia nodular que es la responsable de la aparición de los síntomas que se describen más abajo en los pacientes de edad avanzada (65 años en los de raza blanca y 60 en los sujetos de raza negra). Los síntomas característicos de la HBP son (23):

1. Dificultad y obstrucción para la micción causada por la compresión extrínseca de la uretra prostática por causa de la propia hiperplasia.

2. Retención de orina a nivel vesical o incapacidad para el vaciamiento completo de la vejiga. Este fenómeno, favorece la sobreinfección de la orina generando un aumento de la frecuencia de cistitis y pielonefritis en estos pacientes. Igualmente, puede producir una retención urinaria aguda persistente que en muchas ocasiones obliga al sondaje vesical urgente.

La HBP se produce por efecto de la dihidrotestosterona (DHT). La DHT se sintetiza por efecto de la enzima 5 α -reductasa sobre la testosterona en las células estromales de la próstata. Las células epiteliales carecen de esta enzima, por lo que son las células estromales prostáticas la principal fuente de DHT para las células epiteliales prostáticas adyacentes. La DHT se comporta como una hormona de acción paracrina sobre las células epiteliales prostáticas. La DHT atraviesa la membrana plasmática y se une a receptores de andrógenos del citosol. Seguidamente, se transloca al núcleo para inducir la expresión de factores de crecimiento con acción mitogénica para las células epiteliales y estromales prostáticas (vías autocrina y paracrina). Aunque la testosterona también puede unirse a los receptores de andrógenos y estimular el crecimiento celular, la DHT es 10 veces más potente. Por el contrario, si exponemos tejido prostático hiperplásico a inhibidores de la enzima 5 α -reductasa, se reduce la producción de DHT y disminuyen la hiperplasia nodular periuretral. Este efecto farmacológico de los inhibidores de la enzima 5 α -reductasa se usan en la práctica clínica para aliviar la obstrucción urinaria (23).

1.2.5 El cáncer de próstata

El adenocarcinoma de próstata es un tumor maligno con capacidad invasora que está constituido por células secretoras. Es infrecuente antes de los 50 años y su prevalencia va aumentando progresivamente con la edad (20% en individuos de 50-60 años de edad y 70% en aquellos de 70-80 años de edad) (35). Es infrecuente antes de los 50 años, aunque cada vez parecen diagnosticarse más casos en edades tempranas, probablemente por efecto del uso del PSA como prueba de cribado. En la mayoría de los casos el CPr está relacionado con la edad, teniendo un pico de incidencia en la década de los 70 años de edad. En unos pocos casos, el CPr está relacionado con la presencia de factores hereditarios (36).

Al contrario que otros tumores como el cáncer de pulmón, el CPr no presenta evidencias claras de tener relación con carcinógenos químicos. Esto puede deberse en gran medida a la heterogeneidad celular propia de esta glándula (37).

El CPr se origina en las glándulas prostáticas principales de la zona periférica, la más distal a la uretra, por lo que los síntomas urinarios no aparecen en las fases iniciales. Esta localización tan periférica permite, en muchos casos, su detección mediante el tacto rectal (23). Con el fin de detectar de manera precoz el CPr, se suele usar, a modo de técnica de cribado o *screening*, la detección de los niveles plasmáticos del PSA. Cuando a un paciente se le detectan niveles elevados de PSA en suero, se busca la confirmación diagnóstica mediante biopsia transrectal con aguja.

En raras ocasiones el CPr se expresa como dolor a nivel del esqueleto axial. Esto ocurre cuando se detecta el CPr en fase avanzada, cuando ya han aparecido metástasis óseas.

El adenocarcinoma de próstata es la forma más frecuente de cáncer en los hombres y fue responsable del 27% de los cánceres en EEUU en 2014. Durante las últimas décadas, la mortalidad por CPr se ha reducido de forma significativa, de manera que en la actualidad, sólo provoca el 10% de todas las muertes por cáncer en EEUU.

Esta mortalidad relativamente baja de los hombres con CPr depende en parte de un aumento de la detección de la enfermedad por la detección selectiva, aunque se discute la eficacia del programa de cribado de CPr para salvar vidas. Esta aparente paradoja está relacionada con la amplia variación de la evolución natural del CPr, que puede ir desde una forma agresiva y rápidamente mortal a otra de baja actividad y sin trascendencia clínica; que lleva a que en bastantes ocasiones, el CPr sea un hallazgo casual frecuente en las autopsias de hombres que fallecen por otras causas. Por ello, se podría decir que muchos de ellos mueren “con” CPr más que “por” presentar esta enfermedad (19).

Actualmente, no es posible identificar con certeza los tumores que tendrán un comportamiento más agresivo, y por tanto, aunque es indudable que se salvarán algunas vidas mediante la detección y el tratamiento precoz del CPr es igualmente cierto que otros serán “curados” de tumores que no habrían tenido consecuencias clínicas.

Según los estudios clínicos y experimentales, los andrógenos, la herencia, los factores medioambientales y las mutaciones somáticas adquiridas son los factores implicados en la patogenia y la progresión de CPr.

- Los andrógenos tienen una importancia esencial en el desarrollo del CPr, de hasta el punto de que el CPr no se desarrolla en hombres castrados antes de la pubertad, lo que indica que los andrógenos proporcionan el ambiente celular necesario para el desarrollo del CPr. Esta dependencia de los andrógenos se extiende hasta los cánceres establecidos, que a menudo involucionan, al menos durante un tiempo, tras la castración quirúrgica o química. Es destacable, que los tumores que resisten al tratamiento con antiandrógenos suelen adquirir amplificaciones o mutaciones en el gen del receptor de andrógenos, que permiten a dichos receptores activar la expresión de los genes diana a pesar del tratamiento (19). No obstante, aunque el CPr depende de los andrógenos para su supervivencia, igual que la próstata normal, no existe evidencia de que los andrógenos promuevan la carcinogénesis ni de que las concentraciones de andrógenos incrementen el riesgo de CPr (19).
- La *herencia* también contribuye, dado que los familiares de primer grado de los pacientes con CPr tienen un mayor riesgo. El CPr es raro en asiáticos y su incidencia es máxima en afroamericanos y en los países escandinavos. La enfermedad agresiva clínicamente significativa es más frecuente en los afroamericanos que en los pacientes blancos. Los estudios de asociación pangenómicos (GWAS) han identificado una serie de variantes genéticas que se han asociado a un aumento del riesgo de

desarrollar un CPr (19,38–40). Aunque cada variante solo aumenta el riesgo un poco, el efecto es multiplicativo, de forma que los hombres con múltiples alelos de riesgo pueden tener hasta el quíntuple de riesgo en comparación con la población general (19).

- El ambiente también participa en el desarrollo del CPr como se demuestra por los estudios con poblaciones inmigrantes, como por ejemplo el estudio que demuestra que la incidencia del CPr aumenta en los inmigrantes japoneses de EEUU, aunque sin llegar a alcanzar la prevalencia de la población nativa. Además, la incidencia del CPr clínicamente significativo está aumentado en Asia a medida que la dieta asiática se va occidentalizando. No obstante, aún desconocemos la relación entre los componentes específicos de la dieta y el riesgo de CPr.
- Como sucede en otros tumores, las aberraciones genéticas son las responsables de la transformación celular. En los tumores primarios, existen frecuentes variaciones en el número de copias en regiones cromosómicas específicas y reordenamientos génicos. Los reordenamientos génicos más frecuentes en el CPr generan genes de fusión que contienen el promotor regulado por andrógenos del gen *TMPRSS2* y la secuencia de codificación de los factores de transcripción de la familia ETS. Se encuentran genes de fusión *TMPRSS2-ETS* en aproximadamente un 40-60% de los cánceres de próstata de las poblaciones blancas y se producen en fases relativamente precoces de la oncogénesis. Es importante observar que la prevalencia de estos reordenamientos es inferior en los afroamericanos y otros grupos étnicos.

Otras mutaciones determinan con frecuencia la activación de la vía de transmisión de señales PI3K/AKT; las más frecuentes de ellas son las mutaciones con pérdida de función del supresor de tumor PTEN, que actúa como un freno para la actividad de PI3K.

Normalmente, los carcinomas que se detectan clínicamente no son visibles macroscópicamente. Las lesiones más avanzadas aparecen como lesiones blancas o grises, firmes, y con bordes mal definidos que infiltran la glándula adyacente (19).

El epitelio de la glándula normal está muy bien organizado en dos capas. La primera se sitúa contigua a la membrana basal y está constituida por tres tipos celulares principales, que constituyen el 40% del total de células epiteliales: las células madre, las células transitorias amplificadas y las células basales comprometidas. La segunda capa está constituida por células secretoras de aspecto columnar que se orientan hacia el lumen de la glándula y forman el 60% del epitelio (37,41).

La mayoría de los CPr son adenocarcinomas moderadamente diferenciados que producen glándulas bien definidas. Estas son menores que las glándulas benignas y están revestidas por una capa uniforme simple de epitelio cúbico o cilíndrico bajo y no están rodeadas por la capa de células basales presente en las glándulas benignas. Una diferencia evidente con las glándulas benignas es que las malignas aparecen densamente agregadas y, carecen de ramificaciones y repliegues papilares (19).

El citoplasma de las células tumorales varía de pálido o transparente (como en las glándulas benignas) a claramente anfófilo (morado oscuro). Los

núcleos están aumentados de tamaño y a menudo contienen uno o más nucléolos prominentes. Es habitual, ver alguna variación en el tamaño y forma del núcleo, pero en general, el pleomorfismo no es importante. Las figuras mitóticas son escasas. Al aumentar el grado de malignidad, se aprecian estructuras glandulares irregulares o deshilachadas, glándulas cribiformes, además de sábanas de células o células aisladas infiltrantes. Aproximadamente en el 80% de los casos, el tejido prostático extraído del carcinoma también alberga lesiones supuestamente precursoras denominadas neoplasias intraepiteliales prostáticas de alto grado (PIN-AG). Muchos de los cambios moleculares presentes en los cánceres infiltrantes se encuentran también en el PIN-AG (19).

El CPr se clasifica utilizando el sistema de Gleason, creado en 1967 y actualizado varias veces, siendo su última revisión la de 2014 (42–48). Según este sistema, el CPr se clasifica en cinco grados en función de los patrones de diferenciación glandular. El grado 1 representa los tumores mejor diferenciados y el grado 5 se refiere a la ausencia de diferenciación glandular. La mayor parte de los tumores corresponden a los patrones 3, 4 ó 5. Dado que la mayoría de los tumores contienen más de un patrón, se asigna un grado principal al patrón dominante un grado secundario al siguiente patrón en frecuencia. Después, ambos grados numéricos se suman para obtener la puntuación de Gleason combinada. Los tumores que solo tienen un patrón son tratados como si sus grados principal y secundario fueran el mismo y, por tanto el número se multiplica por dos. En consecuencia, los tumores más diferenciados tienen una puntuación de Gleason de 2 (1+1) y, los menos diferenciados, de 10 (5+5). El nuevo sistema de gradación basado en el patrón glandular ha sido recientemente aceptado por

la Organización Mundial de la Salud (OMS) inicialmente para usarlo combinado con el sistema de Gleason; este sistema oscila entre 1 (pronóstico excelente) y 5 (mal pronóstico) (19,49–51) (tablas 1 y 2).

En EEUU, la mayoría de los cánceres de próstata son lesiones asintomáticas pequeñas y no palpables, que se descubren mediante una biopsia con aguja cuando se ha detectado una elevación de la concentración del PSA. Aproximadamente, un 70-80% de los cánceres de próstata se originan en la parte externa (periférica) de la glándula y un subgrupo de los mismos se puede palpar como nódulos duros e irregulares en el tacto rectal. Una minoría de los carcinomas se descubre de forma inesperada durante el estudio histológico de una muestra de tejido prostático resecado mediante resección transuretral por una HBP. Dada la localización periférica, es menos probable que el CPr cause obstrucción uretral en etapas iniciales respecto a la HBP. Los cánceres localmente avanzados, que a menudo infiltran las vesículas seminales y las zonas periuretrales de la próstata, pueden invadir los tejidos blandos adyacentes, la pared de la vejiga urinaria o incluso el recto. Las metástasis óseas, en particular en el esqueleto axial, son frecuentes en la enfermedad avanzada y normalmente provocan lesiones osteoblásticas (19).

Tabla 1. Patrones de Gleason.

Patrón de Gleason	Descripción
Patrón 1	Nódulo circunscrito de acinos apretados pero separados, uniformes, redondeados a ovales, de tamaño mediano (glándulas grandes de color canela patrón 3).
Patrón 2	Como el patrón 1, bastante circunscrito, pero en el borde del nódulo tumoral puede haber una infiltración mínima. Las glándulas están más sueltamente dispuestas y no son tan uniformes como el patrón de Gleason 1.
Patrón 3	Unidades glandulares discretas. Por lo general, glándulas más pequeñas que las que se ven en el patrón de Gleason 1 o 2. Se infiltra en y entre los acinos de próstata no neoplásicos. Variación marcada en tamaño y forma. Nódulos cribiformes pequeños y suavemente circunscritos del tumor.
Patrón 4	Glándulas microacinares fusionadas. Glándulas mal definidas con una luz glandular mal formada. Glándulas cribiformes grandes. Glándulas cribiformes con un borde irregular. Patrón hipernefrotomatoide (tumor renal del células claras).
Patrón 5	Esencialmente no hay diferenciación glandular, compuesta de hojas sólidas, cordones o células individuales. Comedocarcinoma con necrosis central rodeada de masas papilares, cribiformes o sólidas.

Tabla 2. Pronóstico asociado a cada puntuación de Gleason.

Puntuación de Gleason	Grupo Pronóstico	Pronóstico
Gleason ≤ 6	PGG-I	El más favorable
Gleason 7 (3+4)	PGG-II	Indeterminado
Gleason 7 (4+3)	PGG-III	Indeterminado
Gleason 8	PGG-IV	Poco favorable
Gleason 9 y 10	PGG-V	El menos favorable

La determinación del PSA es la prueba más empleada para diagnosticar y tratar el CPr, pero adolece de una serie de limitaciones. El PSA es un producto del epitelio prostático y normalmente se secreta en el semen.

Aunque la detección selectiva del PSA permite detectar los cánceres de próstata en fases precoces de su evolución, los estudios sobre la evolución natural de la enfermedad (los denominados estudios de “esperar y ver”, “seguimiento activo” o “vigilancia expectante”) han confirmado que muchos cánceres de próstata no tienen repercusión clínica y no precisan tratamiento, incluso durante décadas. El sobretratamiento de estos cánceres indolentes puede provocar una morbilidad significativa, sobre todo disfunción eréctil e incontinencia. Una segunda limitación del PSA como biomarcador es que no es específico del cáncer. La HBP, la prostatitis, el infarto prostático, la instrumentación prostática y la eyaculación pueden aumentar las concentraciones de PSA sérico. Por el contrario, entre un 20 y un 40% de los pacientes con un cáncer limitado a la próstata tienen concentraciones de PSA por debajo de los puntos de corte empleados para identificar a los pacientes con probabilidad de tener un CPr.

Dados estos problemas, la determinación de PSA como prueba de detección selectiva se está replanteando. Por el contrario, cuando ya se ha diagnosticado el cáncer, las determinaciones del PSA seriadas tienen gran utilidad para valorar la respuesta al tratamiento. Por ejemplo, el aumento de la concentración de PSA después de la prostatectomía radical o la radioterapia para la enfermedad localizada (recidiva bioquímica) es indicativo de una enfermedad recidivante o diseminada.

Los tratamientos más frecuentes del CPr clínicamente localizado son la prostatectomía radical y la radioterapia. El pronóstico tras la prostatectomía radical se basa en el estadio anatomopatológico, en la ausencia de infiltración de los márgenes de resección por el CPr, y en el grado de Gleason. El grado de Gleason, el estadio clínico y el PSA sérico son importantes factores predictivos de la evolución después de la radioterapia. Como muchos cánceres de próstata siguen una evolución poco activa, el seguimiento activo (vigilancia expectante) es un procedimiento adecuado en los hombres mayores, en pacientes con enfermedad asociada significativa o incluso en algunos sujetos más jóvenes con una cifra de PSA sérico baja y cánceres pequeños de grado bajo (52,53). El carcinoma metastásico avanzado se trata mediante privación de andrógenos con orquiectomía o administración de agonistas sintéticos de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRJ). Además, existen muchos tratamientos novedosos que reducen la síntesis de andrógenos o la transmisión de señales en el carcinoma de próstata metastásico.

Aunque el tratamiento con antiandrógenos induce remisiones, aparecen de forma casi invariable clones independiente de los andrógenos, que provocan una progresión rápida de la enfermedad y la muerte del paciente. Como se comentó anteriormente, estos clones mutantes siguen expresando en general muchos de los genes que aparecen en la próstata normal dependiente de los andrógenos, lo que sugiere que aparecen mecanismos que reactivan la transmisión de señales androgénicas, incluso en pacientes con terapia de privación de andrógenos (52,54,55).

Se sabe poco sobre las causas del CPr aunque, según los estudios clínicos y experimentales, la edad, la raza, factores endocrinos (56) como los andrógenos, la herencia (57), factores medioambientales y las mutaciones somáticas adquiridas son factores implicados en la patogenia y progresión del CPr. La investigación básica está enfocada en identificar el papel de las hormonas, factores de crecimiento, oncogenes, genes supresores de tumores y de la apoptosis (muerte celular programada); en el desarrollo y progresión del CPr (56).

1.2.5.1 Generalidades del Cáncer

El término cáncer engloba a una serie de trastornos que tienen en común el crecimiento celular incontrolado. Este proceso da lugar a una masa de células que recibe el nombre de neoplasia o tumor.

Desde el punto de vista etiológico, el cáncer es una lesión genética causada por factores hereditarios o ambientales, que se inicia en una sola célula, por lo que puede decirse que el cáncer es una proliferación clonal. Esto no quiere decir que en un mismo individuo no puedan desarrollarse dos o más clonas celulares o dos o más neoplasias malignas independientes tanto en el mismo momento (sincrónicas) como en dos periodos temporales diferentes (metacrónicas).

Entre los factores de riesgo o desencadenantes del cáncer nos encontramos con factores no modificables (edad y sexo, entre otros), factores ambientales (geográficos, ocupacionales, recreativos, exposición a agentes mutágenos -físicos, químicos o biológicos-, etc.) y factores genéticos. La

combinación de estos factores marcará el riesgo global de una persona para desarrollar un cáncer.

La mayoría de los sucesos genéticos relacionados con el desarrollo de un cáncer se producen en células somáticas, y por tanto no se transmiten a la descendencia. Sólo algunos casos de tumores están relacionados con mutaciones en la línea germinal y por tanto pueden transmitirse a la descendencia en forma de cáncer hereditario familiar.

Desde el punto de vista evolutivo, el cáncer se debe a la pluricelularidad. Las células de los organismos pluricelulares superiores mantienen de sus ancestros unicelulares la capacidad de reproducirse mediante la división en dos células, pero a diferencia de aquellos, las células de los organismos complejos van a sufrir un proceso de especialización (diferenciación) que les va a permitir constituir tejidos diferentes. Para ello, se han ido incorporando al genoma una serie de nuevos genes encargados de controlar el proceso de crecimiento y diferenciación celular.

La ventaja que supuso la aparición de los diferentes tejidos conllevó la aparición de un nuevo riesgo: cada vez que una célula se prepara para dividirse el DNA tiene una cierta probabilidad de experimentar una mutación potencialmente cancerígena. Con el fin de evitar estos errores, los organismos superiores se han ido dotando de sistemas cada vez más complejos para controlar y reparar mutaciones con capacidad de producir un cáncer y aún más para detectar precozmente e impedir que una célula con una o varias mutaciones de lugar a un tumor; pero a veces todos los sistemas de control fallan y el cáncer progresa.

Cuando una célula normal se transforma en cancerosa puede adquirir una o varias de las siguientes capacidades que son esenciales para que se desarrolle un tumor (58):

- Capacidad para dividirse con independencia de las señales de crecimiento.
- Ignorar las señales externas de inhibición del crecimiento.
- Evitar la apoptosis.
- Dividirse indefinidamente sin senescencia
- Estimular la angiogénesis de manera continua.
- Capacidad para desprenderse de la masa celular original, cambiar de localización e invadir tejidos adyacentes o distantes estableciendo tumores secundarios denominados metástasis.

Según Hanahan y Weinberg, detrás de estas características se encuentra la inestabilidad del genoma, que genera la diversidad genética que acelera su adquisición; y la inflamación que fomenta múltiples funciones distintivas. En la última década se ha agregado dos factores más: la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la respuesta inmune (58).

Existen numerosas hipótesis que intentan explicar por qué una célula mutada da lugar a un cáncer evitando los sistemas de control. Entre estas hipótesis podemos destacar las siguientes:

- Los biólogos evolucionistas interpretan el cáncer como el producto de un proceso de selección natural. La selección natural favorece las mutaciones ventajosas y a los organismos con mayor éxito

reproductivo, y por tanto las mutaciones que originan tumores perduran y aumentan su frecuencia en las generaciones subsiguientes.

- Existen otras hipótesis basadas en la similitud que tienen algunas células de la masa tumoral con las células madres. Entre las características compartidas más destacables están la de dividirse indefinidamente sin sufrir el fenómeno de senescencia, la autorrenovación, la supervivencia prolongada, la capacidad de generar células con características más diferenciadas, y la de poder crear una nueva masa celular lejos de la masa original. Dentro de este modelo teórico existen dos hipótesis plausibles: una que la célula madre cancerosa provenga de una célula madre totipotencial mutada y otra que postula que una célula madura tras sufrir una mutación sufre un proceso de “desdiferenciación” que la convierte en célula madre tumoral. Ya en los años sesenta del siglo pasado, algunos autores habían advertido que en la masa tumoral existían células con distinta capacidad para generar tejido tumoral en un entorno nuevo. El esfuerzo se centra ahora en identificar células madre cancerígenas en diversas enfermedades malignas hematopoyéticas, y definir las células de origen, de manera que se pueda delinear la acumulación escalonada de eventos genéticos/epigenéticos necesarios para el desarrollo de células madre del cáncer. Una comprensión detallada de estos procesos podría conducir al desarrollo de productos terapéuticos que traten de manera más efectiva las neoplasias hematopoyéticas y potencialmente otros cánceres (59). Los avances terapéuticos en las últimas décadas permiten que la mayoría de los pacientes con cáncer

logren respuestas clínicas importantes, con menos efectos secundarios y mejor calidad de vida que con las terapias clásicas. A pesar de ello, la mayoría de los pacientes con cáncer finalmente recaen y mueren a causa de su enfermedad. Actualmente, se ha demostrado que muchos cánceres contienen células que son fenotípica y biológicamente similares a las células madre normales; estas llamadas células madre del cáncer (CSC) típicamente constituyen solo una pequeña fracción de la masa tumoral total, pero teóricamente albergan toda la capacidad de autorrenovación. Además, las CSC parece ser relativamente resistente a las terapias anticancerígenas estándar mediante la adopción de los mecanismos de defensa intrínseca de las células madre normales, como la quiescencia, las bombas de eflujo o de expulsión activa (bombas que permiten expulsar de manera activa múltiples fármacos y que se han descrito entre los mecanismos de resistencia a fármacos) y las enzimas desintoxicantes. La evidencia emergente sugiere que las respuestas iniciales en el cáncer representan la efectividad terapéutica contra las células cancerosas no autorrenovables, mientras que el fracaso de la terapia y la subsecuente recaída depende de las citadas CSC (60,61). Una mejor comprensión de la biología de las CSC, así como la revisión de la diana terapéutica de los fármacos antineoplásicos puede revolucionar el tratamiento de muchos cánceres y secundariamente mejorar la supervivencia y disminuir el riesgo de recaídas (60,62).

- Existe otra hipótesis explicativa basada en que la célula cancerosa proviene de una célula que ha acumulado más de una mutación en

genes relevantes para el control de la proliferación, síntesis y corrección de errores del DNA, y genes relacionados con la maquinaria responsable de la muerte celular programada (apoptosis). Entre estos genes tenemos aquellos que promueven la síntesis de DNA y la proliferación celular, que son conocidos como protooncogenes y que una vez mutados reciben el nombre de oncogenes. Las mutaciones sufridas por estos genes son de ganancia de función y se comportan como genes dominantes. Además tenemos genes supresores o inhibidores de la síntesis de DNA. Estos genes al mutar pierden su función y dejan de inhibir la proliferación celular lo que favorece la expansión del clon mutado. Estas mutaciones se comportan como recesivas.

Se ha descrito el relevante papel que desempeña el entorno de señalización o nicho en el que residen las células tumorales. Este entorno parece ejercer una influencia determinante sobre el inicio y el mantenimiento del proceso canceroso. Las señales emitidas por el tejido circundante y concretamente por las células estromales y la matriz extracelular son esenciales a la hora de preservar la identidad de una célula concreta y dirigir su comportamiento. Estas señales de nicho son las encargadas de mantener a las células madres bajo control, mediante señales represoras, pero manteniendo su estado de indiferenciación y su expansión ilimitada dando respuesta a las necesidades de mantener el tamaño del tejido, en este caso del tumor.

1.2.5.2 Etiopatogenia del cáncer de próstata

El CPr comparte con otros tumores una serie de aspectos etiológicos entre los que destacan los aspectos genéticos, factores sociodemográficos, la inflamación, los agentes infecciosos, y los hábitos de vida (aspectos dietéticos y de actividad física). La mayoría de los CPr son de tipo esporádico y una pequeña parte de ellos son hereditarios.

Como en otros tumores, el CPr suele desarrollarse a partir de una acumulación de cambios genéticos sobre la línea somática, y cambios epigenéticos que tienen como resultado la inactivación de genes supresores de tumores y de genes guardianes, y la activación de protooncogenes (63,64). Además, existe evidencia de que la presencia de inestabilidad genética puede favorecer la progresión tumoral (45–60).

Entre los factores que hacen que el CPr sea una enfermedad muy común están la edad avanzada, los antecedentes familiares y la etnia. Desde hace unos años se viene postulando el papel de componentes de la dieta en el desarrollo de cáncer (81), al igual que algunos elementos que se han asociado con el desarrollo de tumores debido a su capacidad mutagénica (tabaco (80,82), alcohol (35,83), exposición crónica agentes vivos -tanto virus como bacterias- (84–94), radiaciones (95), etc.).

En un estudio de cohortes de base poblacional realizado por Farris et al., en Alberta (Canadá) sobre el consumo de alcohol antes y después de recibir el diagnóstico de un CPr, se puso de manifiesto que el consumo de alcohol después del diagnóstico se asoció con una mayor mortalidad por CPr (Hazard Ratio: 2,67; IC del 95%: 1,28 a 5,56) una vez controlados otros factores (35).

La evidencia epidemiológica, en general, sugiere que el consumo habitual de una dieta rica en grasas saturadas, carnes bien elaboradas (OR: 1.28-2.16) y calcio confiere una mayor probabilidad de padecer un CPr avanzado. Los efectos de otros nutrientes y alimentos en el desarrollo del CPr avanzado fueron inconsistentes en todos los estudios epidemiológicos (96).

Los estudios ecológicos y migratorios sugieren de manera consistente que el consumo de grasa y especialmente grasa animal (principalmente grasa saturada) se asocia con un mayor riesgo de CPr (96–101). Esta observación ha ganado un mayor apoyo debido al aumento progresivo de la incidencia de CPr en el este de Asia durante las últimas décadas, probablemente como consecuencia de la transición nutricional hacia la dieta occidental (102). Sin embargo, los resultados de los estudios epidemiológicos recientes sobre el efecto de la grasa y los tipos de grasa en el riesgo de CPr y en su progresión son heterogéneos (38–40,51,81,103). La mayoría de los estudios de casos y controles han demostrado una asociación significativa y positiva entre la ingesta de grasa total, y especialmente grasas saturadas, y el riesgo de CPr avanzado, con una OR entre 1,4 y 8,7 (100,104–108). Una serie de estudios en animales sugieren que la grasa está implicada en la carcinogénesis de próstata al promover el estrés oxidativo y la inflamación en la próstata (109–111).

Además de los factores reseñados arriba, la inflamación crónica también parece jugar un papel relevante en el desarrollo y la progresión del CPr. La causa de la inflamación prostática no está del todo establecida, aunque se han descrito varios fenómenos desencadenantes que pueden actuar de forma individual o combinada: la infección directa de la próstata, el reflujo urinario que genera un

trauma físico y químico, factores dietéticos y exposición a los estrógenos. Además cualquiera de ellos puede alterar la tolerancia inmunológica y desencadenar una reacción autoinmune contra la próstata (84,90–92,112,113).

Se ha descrito como la activación de NF- κ B y otros muchos mediadores de la inflamación contribuyen al desarrollo y progresión del CPr. Los mecanismos y vías de la inflamación también se han asociado con el desarrollo de la resistencia a la castración y la resistencia frente a otras estrategias de depleción de andrógenos (114).

1.2.5.3 Aspectos clínicos del cáncer de próstata

La mayoría de los cánceres de próstata son lesiones asintomáticas pequeñas y no palpables. El método de diagnóstico más frecuente es la biopsia con aguja que se realiza cuando se detecta una elevación de la concentración sérica del PSA en un determinado paciente. Aproximadamente, un 70-80% de los cánceres de próstata se originan en la parte externa (periférica) de la glándula, por lo que un subgrupo de los mismos se puede palpar como nódulos duros e irregulares en el tacto rectal. Una minoría de los carcinomas se descubre de forma inesperada durante el estudio histológico de una muestra de tejido prostático extirpado mediante resección transuretral como tratamiento para una HBP. Dada la localización periférica, es menos probable que el CPr cause obstrucción uretral en etapas iniciales respecto a la HBP.

Los cánceres localmente avanzados, a menudo infiltran las vesículas seminales y las zonas periuretrales de la próstata y pueden invadir los tejidos blandos adyacentes, la pared de la vejiga urinaria o (con menor frecuencia) el recto. Las metástasis óseas, en particular en el esqueleto axial, son frecuentes

en la enfermedad avanzada y normalmente provocan lesiones osteoblásticas (productoras de hueso) que se pueden detectar en las *gammagrafías óseas*.

Como se ha explicado, líneas arriba, la determinación del PSA es la prueba más empleada para detectar precozmente el CPr, pero presenta una serie de limitaciones. Por este motivo, su uso en los programas de cribado está muy discutido en la actualidad. Möller et al. han desarrollado recientemente un modelo de predicción que incluye la información clínica, los niveles de PSA y los polimorfismos de un único nucleótido (SNP, siglas en inglés de *single nucleotide polymorphism*), validándolo de forma independiente en una cohorte en el contexto de la práctica clínica y demostrando una reducción del número de biopsias innecesarias y con una proporción baja de retrasos diagnósticos en hombres con puntuación de Gleason ≥ 2 (114).

Debido a los problemas anteriormente descritos, la determinación de PSA como prueba de detección selectiva se está replanteando. Pero por el contrario, cuando ya se ha diagnosticado el cáncer, las determinaciones del PSA seriadas tienen gran utilidad para valorar la respuesta al tratamiento. Así, el aumento de la concentración de PSA ($>0,2\text{ng/ml}$) después de la prostatectomía radical o la radioterapia para la enfermedad localizada es indicativo de una enfermedad recidivante o diseminada.

Los tratamientos más frecuentes del CPr clínicamente localizado son la prostatectomía radical y la radioterapia. El pronóstico tras la prostatectomía radical y la radioterapia se basa en: el estadio anatomopatológico, la afectación o no de los márgenes de resección quirúrgica, el grado de Gleason, el estadio clínico y los niveles séricos del PSA. Como muchos cánceres de próstata siguen

una evolución poco activa, el seguimiento activo (vigilancia expectante) es un procedimiento adecuado en los hombres mayores, en pacientes con enfermedad asociada significativa o incluso en algunos sujetos más jóvenes con una cifra de PSA sérico baja y cánceres de pequeño tamaño y bajo grado.

1.2.5.4 Aspectos genéticos y moleculares del cáncer de próstata

Se ha demostrado que el CPr tiene un gran componente hereditario, tanto que se considera uno de los cánceres más heredables. Este componente genético está constituido por variantes genéticas que pueden ser numerosas y comunes o pocas y raras de la línea germinal. De hecho, los estudios de asociación en genoma completo (GWAS, siglas en inglés de *genome-wide association studies*) han producido el mayor número de variantes de riesgo en este cáncer en comparación con cualquiera de los otros tipos comunes de cáncer. Sin embargo, antes de trasladar los perfiles de riesgo generados a partir de estas variantes a su uso en el ámbito clínico para la detección y tratamiento específico es necesario llevar a cabo una serie de estudios de investigación clínica translacional. Estas variantes explican, en parte, la etiología del CPr, así como parte de la heterogeneidad descrita en la respuesta ciertos grupos de pacientes a los tratamientos habituales, pero no aclara las interacciones complejas con los factores ambientales. Este es un campo relativamente nuevo de la investigación ya que los primeros estudios GWAS realizados en CPr datan de 2006 (115,116). Ambos estudios, realizados con diferentes metodologías, convergieron en el mismo locus cromosómico, 8q24. Este locus contiene múltiples SNPs asociados con el riesgo de CPr (117) y con otros cánceres, como el de colon, mama y ovario (118). Un metaanálisis publicado por Li et al. en 2017

(119), sugiere que cinco polimorfismos del locus 8q24 (rs6983267 T> G, rs1447295 C> A, rs16901979 C> A, rs6983561 A> C y rs10090154 C> T) tienen una fuerte asociación con la susceptibilidad de desarrollar CPr. Por lo tanto, los polimorfismos 8q24 podrían considerarse los marcadores ideales para el diagnóstico y la terapia del CPr. Este trabajo está en línea con el enfoque de la investigación actual de la medicina personalizada.

La progresión del cáncer y el desarrollo de metástasis ocurren porque se produce una selección de las células que acumulan mutaciones adquiridas que favorecen el crecimiento y la supervivencia. Las células con estas características aumentarán en número en un proceso parecido a la selección darwiniana de las especies, como describió Nowell en 1976 (120). Entre los factores que influyen en los procesos de selección natural (fuerzas selectivas), se incluyen: factores intrínsecos al propio huésped (incluido el sitio específico en el que se asientan las metástasis), y factores derivados de las terapias antineoplásicas.

Según Arnold et al., el examen de las mutaciones en múltiples sitios tumorales dentro de un paciente individual, puede hacernos una idea de las variantes genéticas que favorecen la metástasis sitio-específica. Al comparar estos datos entre múltiples personas, pueden identificarse patrones recurrentes que nos permitan identificar qué alteraciones son fundamentales para que una metástasis sitio-específica sea exitosa (120).

1.2.5.4.1 *Genoma mitocondrial y cáncer de próstata*

El papel que desempeñan las mutaciones del DNA nuclear en el origen de los tumores, en su agresividad y respuesta a las diferentes terapias antineoplásicas es bien conocido; mientras que no lo es tanto el que ejercen las

mutaciones de genoma mitocondrial que se caracteriza heredarse exclusivamente por la vía materna.

En este sentido, Hopkins et al., mediante la secuenciación de los genomas mitocondriales de 384 pacientes con CPr localizado, identificaron que por cada paciente existía una mediana de un polimorfismo de nucleótido único en el DNA mitocondrial (mtSNV, en sus siglas en inglés). Algunos de estos mtSNV ocurren en puntos de mutaciones recurrentes y se asocian con un comportamiento más agresivo del tumor. Los pacientes más jóvenes tenían menos mtSNV que aquellos que fueron diagnosticados a una edad más avanzada. Estos mismos autores llegaron a demostrar que existían fuertes vínculos entre los perfiles de mutaciones mitocondriales y nucleares con la concurrencia entre mutaciones específicas. Por ejemplo, ciertas regiones de control mtSNVs coincidían con la ganancia del oncogén MYC, lo que se asociaba con la supervivencia del paciente (121).

Arnold et al., en un estudio mediante secuenciación del DNA mitocondrial realizado sobre 10 pacientes con CPr con metástasis óseas, encontraron que la variación genómica mitocondrial fue mayor en los sitios metastásicos que en el tumor primario y que las metástasis óseas tuvieron un número mayor de mutaciones somáticas que las metástasis primarias o de los tejidos blandos, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Los autores concluyen que el genoma no mutó al azar ya que se identificó al menos un "punto caliente" mutacional a nivel de base individual en el nucleótido 10.398, al menos en las metástasis óseas, lo que indica una presión selectiva generalizada para células metastásicas óseas que habían adquirido la mutación 10.398 en el DNA

mitocondrial. Dos mutaciones recurrentes adicionales (tRNA Arg y tRNA Thr) apoyan el concepto de "supervivencia del más apto" del sitio óseo según lo revelado por la variación en el genoma mitocondrial y la presión selectiva ejercida por el sitio metastásico (120).

1.2.5.5 Cáncer de próstata y microambiente

Durante mucho tiempo, el genotipo y el fenotipo de la célula tumoral se consideraron como los únicos factores determinantes del crecimiento y la aparición de metástasis en el cáncer. Desde hace un decenio más o menos, se viene sugiriendo que el microambiente tumoral juega un papel importante en la progresión tumoral, la adquisición de la independencia androgénica y la metástasis a distancia en el CPr.

En una revisión de la literatura publicada por Chung et al., se concluye la interacción entre el tumor y su microambiente tiene un papel decisivo en el control del crecimiento local del cáncer, la invasión y el desarrollo de metástasis a distancia. En este sentido, los autores defienden que las alteraciones genéticas en las células de un CPr no son suficientes, por sí solas, para conferir un estado metastásico sin que exista un microambiente tumoral favorable (121).

El cáncer no es una enfermedad de una única célula. Las células cancerosas, el microambiente que la rodea y la interacción entre ellos son necesarios para que el CPr se desarrolle, progrese hacia la independencia androgénica y genere metástasis a distancia. Según Chung et al., es altamente plausible que las metástasis se originen a partir de clones de células recién evolucionados de un CPr en vez de formarse a partir de clones seleccionados o expandidos de clones preexistentes. La célula migrará hacia un nuevo

emplazamiento e iniciará la progresión de la metástasis una vez se hayan producido una serie de interacciones célula (tumoral)-célula (estromal) y célula (tumoral)-matriz y microambiente del tejido huésped (121).

Descifrar los mecanismos moleculares subyacentes a la interacción tumor-estroma puede ayudar a diseñar tratamientos médicos específicos para el crecimiento y la metástasis del CPr. Existen varios autores que defienden que para diseñar una terapia efectiva se requiere una comprensión más profunda de la interacción entre el tumor y el estroma. Las estrategias terapéuticas enfocadas al binomio tumor-estroma parecen prometedoras en comparación con aquellas dirigidas exclusivamente a las células tumorales, en cuanto a frenar la progresión y erradicar el CPr, así como a tratar las metástasis recién desarrolladas en órganos óseos y viscerales (121).

Hasta este momento, se sabe poco sobre la base transcripcional de las interacciones celulares en el microambiente de CPr humano. Para aclarar el mecanismo de progresión y la metástasis de este tumor, Ashida et al., investigaron la interacción entre las células epiteliales y las células del estroma del CPr mediante un perfil de expresión genómica. Estos autores partían de la hipótesis de que las células tumorales podrían inducir a las células del estroma a diferenciarse en los llamados fibroblastos asociados al cáncer (CAF, en sus siglas en inglés), y que éstos podrían contribuir a la invasión del cáncer y a la metástasis (121).

La vía del mevalonato (MVA) con frecuencia presenta una alteración de la regulación o una sobreexpresión en muchos cánceres, lo que sugiere una dependencia del tumor en esta vía metabólica clásica. En un experimento

realizado por Ashida et al. (121), en el que cultivaron simultáneamente células estromales normales de próstata humana con células de la línea LNCaP procedentes de CPr humano se produjo una inducción de los genes codificadores de las enzimas de la vía del mevalonato 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa 1 (HMGCS1) y 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCR). El bloqueo de la expresión de HMGCS1 endógeno en células estromales o de la HMGCR en células de CPr por shRNA dio como resultado una reducción significativa de la viabilidad de las células tumorales. De manera importante, la sobreexpresión exógena de HMGCS1 o HMGCR en células procedentes de un CPr o en células estromales de la próstata estimuló el crecimiento de las células tumorales, lo que sugiere un posible mecanismo de acción autocrino/paracrino. El análisis inmunohistoquímico confirmó que HMGCS1 y HMGCR estaban sobreexpresados en el estroma del CPr, especialmente cuando el cáncer aparecía en edad temprana. Estos resultados proporcionan pistas sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la invasión del CPr y la metástasis, y sugieren que la sobreexpresión de HMGCS1 y HMGCR tanto en células neoplásicas como estromales pueden servir de dianas para el diseño de nuevas terapias contra el CPr. De hecho, Pandyrá et al., en un estudio realizado en células de cáncer de pulmón (CPu) y cáncer de mama (Cma), concluyeron que las terapias dirigidas a múltiples niveles de la ruta del mevalonato, incluido el bloqueo del ciclo de retroalimentación de esteroides iniciado por el tratamiento con estatinas, es una estrategia antitumoral dirigida eficaz (121).

Las interacciones recíprocas entre el tumor y el estroma circundante se han descrito en diversos tumores sólidos, incluido el CPr. En el estroma en el que está inmerso el tumor se producen una serie de modificaciones que reciben

el nombre de “respuesta desmoplásica” o “estroma reactivo”. Estos cambios conducen a crecimiento aberrante y a la transformación morfológica del estroma y los tejidos conectivos que rodean al tumor. Esta respuesta desmoplásica contribuye a la transición de los fibroblastos del estroma a miofibroblastos, y a la acumulación y remodelación de la matriz extracelular (ECM). Durante el proceso de remodelación se produce un aumento en la producción y elaboración de matrices solubles e insolubles críticas unidas a tejidos. De estas moléculas se envía una señal de peligro al sistema inmune que conduce al reclutamiento de células inflamatorias infiltrantes. La respuesta inflamatoria normal, generalmente culmina en la regeneración del tejido lesionado promoviendo la angiogénesis local y la regeneración tisular. Sin embargo, en el caso del cáncer se instaura un "círculo vicioso" que involucra una interacción-intercomunicación (crosstalk, en inglés) entre las células tumorales, el microambiente circundante y la respuesta inflamatoria persistente (121).

1.2.5.6 Cáncer de próstata e inflamación

Las evidencias epidemiológicas sugieren que aproximadamente el 20% de los cánceres en humanos se asocian a inflamación crónica, infección crónica o ambas (122,123). Según De Marzo et al., el daño tisular repetido y los procesos de regeneración en ambiente rico en oxígeno y nitrógeno altamente reactivos, parecen estar implicados en el proceso de la carcinogénesis. El óxido nítrico, el peróxido de hidrógeno junto a otras moléculas liberadas por las células inflamatorias interaccionan con el DNA de las células epiteliales en proliferación produciendo alteraciones permanentes en el genoma, tales como mutaciones puntuales, deleciones o reorganizaciones (124).

Algunos autores han relacionado la atrofia prostática focal con un aumento de la incidencia de CPr. La localización predominante en la zona periférica, el incremento de marcadores inmunohistoquímicos y moleculares de proliferación celular y la presencia de células frecuentes en los CPr hacen plausible esta hipótesis (124). La atrofia focal prostática no se relaciona con una disminución de los andrógenos circulantes; en realidad consiste en una atrofia parcheada del epitelio constituido tanto por células quiescentes como proliferativas. En las neoplasias prostáticas intraepiteliales y en el CPr las células en proliferación no están en la capa basal como en las glándulas normales sino que aparecen en la capa de células secretoras (124,125).

La inflamación como elemento característico de la inmunidad innata, se considera un elemento sustancial y omnipresente en todas las enfermedades crónicas, y en los últimos años ha pasado a ser un punto de interés en las investigaciones sobre el cáncer. Según Weinberg, la inflamación opera como un mediador esencial en las etapas intermedias del desarrollo tumoral (126).

Además de las células cancerosas, los tumores exhiben otra dimensión de complejidad: contienen un repertorio de células reclutadas, aparentemente normales, que contribuyen a la adquisición de rasgos distintivos al crear el "microambiente tumoral". El reconocimiento de la amplia aplicabilidad de estos conceptos permitirá el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer (126).

Los mecanismos moleculares que subyacen a la patogénesis del cáncer asociados a la inflamación son complejos e involucran tanto al sistema inmune innato como al adaptativo (87,127). Aunque los oncogenes virales pueden

contribuir directamente a la transformación neoplásica, no se requieren ni oncogenes, ni oncogenes codificados por patógenos para que las células inflamatorias induzcan cáncer (86). De hecho, los compuestos químicos altamente reactivos, incluyendo superóxido, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico se liberan de células inflamatorias fagocíticas activadas del sistema inmune innato, y pueden causar daño oxidativo o por óxido nítrico al DNA en las células epiteliales, o reaccionar con otros componentes celulares tales como fosfolípidos, iniciando una reacción en cadena de radicales libres (93).

El resultado es que muchas células epiteliales del hospedador se dañan y mueren, y para preservar la función de barrera del epitelio, estas células deben reemplazarse por la división de la célula progenitora residente y/o células madre. Las células epiteliales que experimentan la síntesis de DNA en el entorno de estos agentes que dañan el DNA tienen un mayor riesgo de mutación. El estrés oxidativo o por óxido nítrico desempeña un papel relevante en el desarrollo del CPr, lo que se ve reforzado por los datos epidemiológicos, que indican que el consumo de ciertos tipos de antioxidantes en la dieta se asocian con un riesgo reducido de CPr (128). Las células inflamatorias también secretan citoquinas que promueven la proliferación de las células epiteliales y estimulan la angiogénesis (129).

En términos de progresión de la enfermedad, las células inflamatorias migran fácilmente a través de la matriz extracelular como resultado de la liberación de enzimas proteolíticas y su naturaleza móvil inherente. Por lo tanto, podrían facilitar la invasión de las células epiteliales en los compartimentos del estroma, del árbol vascular y, en última instancia, favorecer la metástasis de las

células tumorales (130,131). Otro mecanismo citado consiste en la interrupción de la producción y regulación de citoquinas, incluidas las deficiencias de citoquinas. Estos fenómenos conducen a un aumento de la inflamación y el cáncer, ya sea en respuesta a una infección con un organismo comensal o a carcinógenos químicos (132). Un mecanismo final es que ciertas respuestas inmunes pueden amortiguar directamente los mecanismos de vigilancia inmunitaria antitumoral mediados por células, evitando así una reacción inmune contra el tumor que potencialmente podría eliminar el cáncer (133).

En regiones del mundo con alta incidencia de CPr, la inflamación de la próstata es esencialmente omnipresente (59). Aunque la mayoría es asintomática, particularmente si afecta la zona periférica de la próstata donde se originan cánceres, hace tiempo que se sabe que la prostatitis conduce diagnósticos de CPr independientemente de su propensión a causar la enfermedad, porque tiende a elevar los niveles séricos de PSA.

Esta idea viene sustentada por la presencia de infiltrados inflamatorios en las neoplasias prostáticas que se asocian a atrofas focales del epitelio generalmente localizadas en la zona periférica, que es el área en la que de manera predominante se desarrollan los CPr. No se trata de una atrofia simple como la que ocurre tras una lesión inflamatoria sobre un tejido normal, se trata de un epitelio atrófico pero con una fracción de proliferación elevada, motivo por el que De Marzo et al., le han dado el nombre de atrofia inflamatoria proliferativa (PIA, en sus siglas en inglés) (90,113). La PIA alberga algunas modificaciones genéticas y algunas de las vías moleculares relacionadas con el CPr como NKX3.2 y CDKN1B que codifican la p27, y PTEN.

Entre los agentes relacionados con la inflamación crónica de la próstata está la infección directa de la glándula. Los organismos implicados en las infecciones prostáticas son bacterias o virus. Las bacterias las podemos dividir en dos grupos: el de las causantes de infecciones de transmisión sexual (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* y *Treponema pallidum*) y el de las bacterias no transmitidas por esa vía (*Propionibacterium acnés*, y principalmente *Escherichia coli*) (90). Entre los virus que infectan a la próstata destacamos: virus del papiloma humano (HPV, en sus siglas en inglés), virus del herpes simple humano tipo 2 (HSV2, siglas inglesas), citomegalovirus (CMV) y el virus del herpes humano tipo 8 (HHV8, siglas en inglés). Algunos de ellos se han relacionado con inflamación crónica de la próstata (90).

Aunque existen muchos estudios que sugieren una asociación positiva entre el CPr y la prostatitis crónica, muchos de ellos adolecen de una metodología adecuada por lo que pueden tener sesgos. En el estudio de De Marzo et al., no se encuentra la asociación citada, excepto en el subgrupo de los hombres que desarrollan CPr a edades más temprana (90,134).

1.2.5.7 Aspectos histopatológicos del cáncer de próstata

1.2.5.7.1 *Morfología y celularidad*

Salvo en raras excepciones, el carcinoma de próstata se origina en la zona periférica de la glándula, generalmente en la región posterior, lo que lo hace fácilmente accesible a la exploración rectal. El origen puede ser multifocal, pero en la mayor parte de los casos estos múltiples focos se han fusionado en una

lesión única de bordes mal definidos en el momento del diagnóstico. En los casos típicos, el corte transversal de la próstata, presenta el tejido neoplásico con un aspecto arenoso y de consistencia firme, rodeado de parénquima prostático que en ocasiones son difíciles de distinguir. Sin embargo, algunos cánceres prostáticos no son duros, especialmente aquellos que no se asocian a una proliferación del estroma. El tejido tumoral suele tener una coloración ligeramente más amarillenta que el tejido circundante, lo que facilita su distinción. En algunas ocasiones el tejido tumoral adopta un color blanco grisáceo lo que dificulta esta diferenciación. La extensión del CPr se produce por invasión local directa, por vía hematógena y linfática. La extensión local, frecuentemente afecta a las vesículas seminales y a la base de la vejiga urinaria, lo que puede dar lugar a una obstrucción ureteral. La diseminación hematógena, afecta principalmente a los huesos y en especial a las vértebras, aunque en ocasiones se propaga a las vísceras, siendo rara la afectación visceral masiva. Las metástasis óseas pueden ser de tipo osteolítico pero son más frecuentes las osteoblásticas por lo que este tipo de lesiones en el varón nos hacen sospechar la presencia de un CPr. Los huesos más afectados, en orden de frecuencia de mayor a menor, son: la columna lumbar, la parte proximal del fémur, la pelvis, la columna dorsal y las costillas. La diseminación linfática, afecta inicialmente a los ganglios obturadores y posteriormente a los perivesicales, hipogástricos, ilíacos, presacros y paraaórticos. La diseminación linfática es frecuente y suele preceder a las metástasis óseas. La presencia de metástasis ganglionares tienen una gran importancia pronóstica (19,20).

Al examen microscópico, la mayor parte de los tumores son adenocarcinomas con patrones glandulares bien definidos, fáciles de reconocer.

En tumores bien diferenciados las glándulas pueden ser pequeñas, por el tamaño medio con una sola capa de epitelio cuboideo o cilíndrico bajo, no distinguiéndose la capa de células basales. En otras ocasiones, las glándulas pueden ser algo mayores formando un patrón papilar o cribiforme. El citoplasma de las células tumorales, es de color pálido, a menudo vacuolado y el núcleo es redondeado u ovalado y vesiculoso. Son muy infrecuentes las mitosis (19,20).

Cuando los tumores bien diferenciados se manifiestan como masas redondeadas de límites netos, hay que hacer el diagnóstico diferencial con una hiperplasia nodular. En términos generales, los acinos malignos son más pequeños y se encuentran menos separados, con patrón cribiforme, con poco estroma intermedio y están tapizados por una sola capa celular. No obstante, no todos los cánceres de próstata están bien diferenciados. En los tumores escasamente diferenciados, es difícil reconocer el patrón glandular. En estos casos las células tumorales crecen formando cordones, nidos o formando sábanas. Al mismo tiempo, las células muestran caracteres citológicos típicos de malignidad (núcleos acidófilos prominentes e intensa actividad mitótica). La producción de estroma puede ser escasa pero en ocasiones es bastante abundante, lo que confiere a la neoplasia una consistencia dura (19,20).

La uniformidad de las células y la ausencia de anaplasia, dificultan el diagnóstico de algunos cánceres de próstata. Se consideran como indicadores más fidedignos de malignidad: la presencia de invasión de la cápsula con sus vasos sanguíneos y linfáticos, la invasión perineural (IPN) o ambas. Existen algunos tipos raros de CPr como son el carcinoma epidermoide, el carcinoma adenoidequístico y el carcinoma de célula transicionales (19,20).

1.2.5.7.2 *Expresión antigénica, marcadores inmunohistoquímicos*

El PSA es una proteína que, como se ha indicado antes, se produce en la glándula prostática. Los niveles en sangre pueden ser elevados en los hombres que tienen CPr. Por esta razón, la concentración plasmática de PSA se ha usado como una prueba de cribado del CPr. Sin embargo, la prueba PSA se desarrolló inicialmente sólo para seguir a aquellos hombres con antecedente de CPr intervenido o radiado. El PSA, además de en el plasma, se puede determinar en el tejido prostático aunque no es útil para el diagnóstico de CPr. En la práctica, la determinación del PSA en tejido, tiene su utilidad en el estudio de metástasis de origen desconocido o cuando objetivamos, por ejemplo, su presencia en una biopsia rectal para confirmar el origen prostático de la neoplasia.

El diagnóstico de adenocarcinoma de próstata en la biopsia de próstata, en la mayoría de los casos, se realiza a través de la de una serie de criterios histológicos en preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina (H-E) estableciéndose el grado de Gleason (46). En ocasiones, a partir del mero examen de esas preparaciones es difícil proporcionar un diagnóstico inequívoco de malignidad, especialmente en el caso de focos escasos limitados o en el caso de lesiones acinares atípicas de pequeño tamaño. Cuando se estudian pequeños focos de glándulas atípicas en muestras de biopsia, el patólogo trata de identificar las diferencias entre las glándulas benignas y las glándulas atípicas, tanto en sus rasgos nucleares, como en los citoplásmicos, y en sus contenidos intraluminales (135). Sin embargo, existen circunstancias en las que los rasgos morfológicos son insuficientes para alcanzar un diagnóstico de certeza de malignidad, lo que obliga a la confirmación de la sospecha mediante

el estudio inmunohistoquímico, especialmente con el uso de marcadores para células basales. El papel de la inmunohistoquímica es la de ser un método complementario para el estudio de focos limitados de carcinoma de próstata. Un rasgo distintivo de las entidades benignas que remedan a los cánceres de próstata, es la presencia de células basales, que están ausentes en las glándulas cancerosas, tal y como fue descrito por Totten et al. en 1953 (136). Sin embargo, la diferenciación morfológica de las células basales de los fibroblastos estromales es frecuentemente dificultosa; además, las células basales pueden pasar inadvertidas en algunas glándulas benignas, lo que obliga al anatomopatólogo a utilizar marcadores inmunohistoquímicos para identificarlas.

1.2.5.7.3 **Marcadores de células basales citoqueratinas**

Los marcadores de células basales, tales como las **citoqueratinas (CK) de alto peso molecular** (*high-molecular-weight cytokeratin*, HMWCK) 34 β E12, la CK 5/6, y la p63, subrayan la presencia de células basales en las glándulas benignas. Esas células se hayan ausentes en los CPr. Tras los primeros resultados de la utilización de la CK como marcador de células basales prostáticas (137), numerosos estudios han demostrado que la aplicación sistemática de anticuerpos frente a las HMWCK resulta particularmente útil para la identificación de las células basales, y aplicable en la rutina. El anticuerpo frente a la CK permite la confirmación histológica en el 58% de los casos; proporciona un resultado correcto en el 18% de los casos dudosos, y modifica el diagnóstico histológico en el 2% de las ocasiones. Sin embargo, este anticuerpo no es de utilidad práctica en el 8% de los casos. Además, no todas las glándulas benignas se tiñen de modo uniforme con marcadores de las células basales. A

esa limitación hay que añadir que el estrato celular desaparece en el 11% de los casos de atrofia, en el 12% de los casos de hiperplasia de células basales y en 10-90% de los casos de hiperplasia adenomatosa atípica. La tinción puede resultar aún menos uniforme en algunas de las lesiones que remedan a los carcinomas prostáticos. En consecuencia, una tinción negativa para marcadores de células basales en un pequeño foco de glándulas atípicas no es diagnóstica de adenocarcinoma de próstata. Un patrón de inmunoreactividad HMWCK en las células basales de glándulas sospechosas casi siempre excluye un diagnóstico de CPr, tal y como ha sido recogido en varios estudios independientes donde se ha establecido que los cánceres de próstata muy raramente expresan HMWCK. Yang et al. han detectado positividad a 34βE12 únicamente en el 2% de los cánceres de próstata metastásicos; en esos casos la inmunoreactividad se encontró restringida a un tipo raro de células con morfología de células tumorales de alto grado, en lugar de detectarse en las células basales.

Existen evidencias de que el CK 5/6 representa un marcador de células basales muy sensible y específico; siendo los resultados insatisfactorios limitados. El CK 5/6, expresado normalmente por el epitelio complejo, es un marcador de las células mesoteliales, del mesotelioma maligno, y de los carcinomas de páncreas, tracto biliar y de mama. Ese anticuerpo reacciona con las células basales prostáticas pero no lo hace con las células tumorales prostáticas ni con las neoplasias intraepiteliales prostáticas (*prostate intraepithelial neoplasia*, PIN). El CK 5/6 no precisa de restauración antigénica compleja, y está dotado de una sensibilidad del 97-100% y de una especificidad del 62%, superior al 40% que se obtiene con la utilización del CK34βE12.

La p63 es otro marcador específico de células basales de los más utilizados en la actualidad en la rutina de los laboratorios de anatomía patológica. La proteína p63, que comparte homología con el gen supresor tumoral p53, parece desempeñar un papel crítico como regulador del crecimiento y del desarrollo del epitelio cutáneo, del cuello uterino, del tracto genital y de la mama y, de modo particular, del desarrollo prostático. Weinstein et al., individualizaron por primera vez la isoforma p63 (138) en las células basales prostáticas, y demostraron el papel determinante del p63 en el desarrollo de la próstata. Por vez primera, pusieron de manifiesto que la expresión inmunohistoquímica de p63 en los acinos prostáticos se limitaba a las células basales con un patrón de inmunorreactividad nuclear, mientras que las células secretoras benignas y los cánceres de próstata resultaron consistentemente negativos para p63. Posteriormente, numerosos estudiosos han confirmado la expresión de p63 en las células basales de las glándulas prostáticas normales; de modo similar, ha quedado demostrado que la gran mayoría de los cánceres de próstata (89-94%) no expresan p63, y que la inmunotinción para p63 representa un novedoso método auxiliar para facilitar el diagnóstico de CPr en biopsias por aguja. Otros estudios indican que las células tumorales prostáticas no expresan p63, por lo que puede utilizarse en el mismo sentido que el CK para el análisis de las pequeñas proliferaciones acinares atípicas sospechosas de malignidad que no presentan un aspecto histológico característico de malignidad.

Una tinción negativa para células basales en unas pocas células sospechosas no es una prueba definitiva de malignidad, dado que algunas entidades benignas pueden exhibir una distribución de células basales parcheada o discontinua. Por ese motivo, un marcador "positivo" específico para

carcinoma de próstata resultaría muy útil para mejorar el nivel de fiabilidad del diagnóstico. Existe un considerable interés en el desarrollo de inmunomarcadores de adenocarcinoma de próstata mediante la tinción específica de las células malignas propiamente dichas. Por esas razones, la identificación del marcador de CPr **a-metilacil-Co A racemasa (AMACR)** ha supuesto un avance para el diagnóstico de los casos dudosos ante la sospecha de adenocarcinoma de próstata (139,140). La AMACR es una enzima de 382 aminoácidos, purificada y caracterizada en 1995 en el curso del estudio del metabolismo lipídico tisular en humanos. Zha et al. demostraron que la AMACR participa en la beta oxidación de ácidos grasos de cadena ramificada y de derivados de los ácidos grasos (141). En el año 2000, Xu et al., mediante la técnica de sustracción de cDNA sumada al screening de microarray de cDNA de alto rendimiento, identificaron tres genes P503s, P504s y P501s; que se expresan de modo diferente en tejido prostático maligno y benigno (142). El gen P504s fue claramente identificado como una AMACR humana. La AMACR aislada y su RNA mensajero (P504s) aparecieron sobreexpresados en la mayoría de carcinomas de próstata. Posteriormente, Jiang et al., generaron anticuerpos monoclonales de conejo específicos, y demostraron la presencia de inmunorreactividad frente a P504s en el CPr (143).

Estudios posteriores confirmaron que la AMACR tiñe el citoplasma de aproximadamente el 80% de los CPr en biopsias por aguja; que en los casos positivos no todas las glándulas tumorales resultan positivas; y que, a menudo, esta tinción no es intensamente positiva. Ciertas variantes histológicas, como las de glándulas espumosas y los carcinomas atróficos y pseudohiperplásicos, eran con frecuencia menos positivos para AMACR (positividad limitada al 60-80% de

los casos). Más recientemente, Schostak et al., (144) demostraron la utilidad de la detección mediante PCR cuantitativa de transcritos de RNA de AMACR en tejido prostático, como alternativa al estudio inmunohistoquímico, especialmente en biopsia por aguja. La sensibilidad fue superior para la combinación de P504s y p63 (95%) en comparación con CK5/6 (57%) y p63 (86%). De modo similar, la especificidad fue superior para la combinación P504s/p63 (95%) en comparación con CK5/6 (88%) y p63 (81%). Según estos autores, la implicación práctica de estos hallazgos es que la tinción con AMACR debería ser interpretada con cautela. Schostak et al. (144) en el estudio con P504s encontraron que la intensidad de la inmunotinción citoplásmica fue moderada-intensa únicamente en el 67% de los casos, y débil en el 31% de los casos. Estos hallazgos podrían explicar los mejores resultados obtenidos con la inmunotinción en comparación con el 80-85% de expresión de P503s habitualmente comunicada en el CPr. Por este motivo, hay autores que consideran que una tinción negativa para AMACR no debería conllevar la sustitución de un diagnóstico de CPr basado en la interpretación de secciones de H-E, por otro de "atipia", ni transformaría un diagnóstico de "atipia" en un diagnóstico de benignidad (145–147). Existen además tinciones duales siendo la más utilizada la que combina p63 con AMACR buscando el marcaje combinado de células basales y células neoplásicas (38,148).

Por otro lado, se ha estudiado el significado de la **mutación de p53** en cáncer prostático, aunque sigue siendo controvertido. La proteína p53 es el producto de expresión del gen supresor p53 implicado en el ciclo celular y en la vía de la apoptosis celular. Su inhibición permite que haya tiempo para la reparación del DNA antes de la división celular. Mutaciones en este gen

posibilitan que la célula pueda dividirse antes de reparar su DNA, conllevando alto riesgo, inestabilidad genética y transformación maligna (149,150), y por tanto de progresión, invasión e incluso de metástasis (151–153). La ausencia de expresión inmunohistoquímica de p53 en el CPr es indicador de peor pronóstico incluso con grado histológico bajo o moderado. Estudios recientes demuestran que la expresión nuclear de p53 es un marcador predictor de recidiva después de cirugía, incluso en aquellos pacientes con hormonoterapia neoadyuvante, llegando a alcanzar el 90% de riesgo de recidiva a los 36 meses. Otros autores sin embargo, postulan que la expresión de p53 es un importante biomarcador en la biopsia prostática y así Brewster en su estudio de 76 pacientes en los que evalúa la expresión para p53, E-Cadherina, Bcl-2 y CD44 en cilindros prostáticos, demuestra mediante análisis multivariante que los únicos marcadores pronósticos independientes de recidiva después de la prostatectomía son el grado histológico de Gleason y la expresión de p53 (154). Asimismo, varios estudios con biopsias prostáticas pretratamiento en series de pacientes tratados posteriormente con radioterapia, por enfermedad localmente avanzada, la inmunoexpresión de p53, se comporta como un factor predictor independiente de recidiva (155–157). Por todo ello, y aunque p53 podría ser un marcador biológico útil; la variabilidad y controversia existente en los trabajos, hace necesario la realización de nuevos estudios multicéntricos con mayor muestra y adecuada metodología para confirmar su utilidad clínica.

Bcl-2: El proto-oncogen bcl-2 está involucrado en la regulación de la muerte programada o apoptosis. Este gen codifica una proteína cuya función es inhibir la apoptosis. Bcl-2 se sobreexpresa en tejido prostático tumoral en el 27%-

68% según las series. La expresión de bcl-2 se ha correlacionado con una alta tasa de recidiva bioquímica tras la prostatectomía (49,158–160).

p27: El gen p27 es miembro de la familia de las quinasas ciclina-dependientes y codifica una proteína que regula negativamente la proliferación celular. La expresión de p27 está consistentemente elevada en próstata normal. La presencia y extensión en el CPr y la recurrencia y la muerte por cáncer. Las expresiones relativas dentro de esta morfología de la pérdida pronóstico adversa de PTEN, y la inactivación dependiente del inhibidor del ciclo celular P27/Kip1 (161,162).

En la actualidad, y a pesar de que los resultados de los estudios sobre las diferentes vías y cascadas de señalización oncogénica son prometedores, no existen todavía biomarcadores moleculares predictivos aplicables en la biopsia prostática de rutina. En los próximos años, la investigación ‘translacional’ permitirá acelerar el intercambio entre la investigación básica, desde los diferentes laboratorios, hacia la investigación clínica aplicada, cuyos resultados se podrán traducir en nuevas y efectivas terapias moleculares del CPr.

1.2.5.8 Sistemas de estadificación del cáncer de próstata

Según Abdel-Rahman (90), para establecer un plan de tratamiento adecuado para un caso de CPr, se deben tener en cuenta múltiples aspectos como son: el funcional (que incluye la comorbilidad y el estado físico) y el de las características del tumor (incluido el grado histológico y el estadio). El sistema de estadificación más común para el CPr es el sistema del Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC, de sus siglas en inglés). Sus sucesivas ediciones han reflejado los avances en la comprensión del pronóstico del CPr.

Para el CPr, se publicaron dos versiones diferentes del sistema de estadificación AJCC: los sistemas de estadificación clínicos y los patológicos.

El valor de las sucesivas ediciones del sistema AJCC ha sido ampliamente aceptado entre los pacientes estadificados clínicamente tratados con modalidades no quirúrgicas; sin embargo, queda por ver si es similarmente predictivo de los resultados entre pacientes tratados quirúrgicamente (90).

El CPr tiene la particularidad de ofrecer importantes dificultades para identificarlo macroscópicamente. Según Lindh et al. (91), un patólogo especialista en patología urológica tiene un alto valor predictivo para identificar el CPr en la pieza macroscópica no fijada. A pesar de esto, una proporción de tumores no se puede identificar a simple vista. Además estos autores concluyen que durante la evaluación macroscópica del tamaño del tumor, casi siempre subestiman las dimensiones reales de éste.

El AJCC, se estableció en 1959 para formular y publicar sistemas de clasificación del cáncer, incluidos los informes de estadificación y resultados finales, que permitirán seleccionar el tratamiento más efectivo, determinar el pronóstico y realizar la evaluación continua de las medidas de control del cáncer. El AJCC está compuesto por 18 organizaciones miembros, y sus actividades son administradas por el Colegio de Cirujanos de Chicago.

El Manual de estadificación del cáncer del AJCC es utilizado por los profesionales de la salud de todo el mundo con el fin de uniformar la descripción y los informes de las enfermedades neoplásicas. La clasificación correcta y la estadificación del cáncer es esencial para asignar el tratamiento adecuado, evaluar los resultados de la administración de los fármacos y de los ensayos

clínicos; y sirva como estándar para los informes locales, regionales e internacionales sobre la incidencia y el desenlace del cáncer.

La octava edición de este manual reúne la mejor evidencia disponible en este momento sobre la estadificación del cáncer y se complementa con marcadores moleculares y los fundamentos moleculares del cáncer. Esta edición sigue siendo la referencia para oncólogos, cirujanos, patólogos, radiólogos, registradores de cáncer y profesionales médicos de todo el mundo para garantizar que todos los que atienden a pacientes con cáncer estén completamente familiarizados con el lenguaje de la estadificación del cáncer.

Por su lado el Colegio Estadounidense de Patólogos (CAP, en sus siglas en inglés), adoptando las recomendaciones de la octava edición del citado manual de estadificación de la AJCC, publicó en 2017 el *“protocolo para el examen de muestras de pacientes con carcinoma de la glándula prostática”* que sirve para describir las muestras procedentes de prostatectomías radicales de pacientes con cualquier tipo de CPr y sus variantes histológicas, tumores neuroendocrinos y carcinomas de células pequeñas de la citada glándula; y no debe ser usado para la descripción de los siguientes tumores localizados en la próstata: los tumores uroteliales y sus variantes, los linfomas, y los sarcomas; para su descripción deberán usarse los protocolos correspondientes (protocolo de uretra (uretra prostática), los protocolos de linfoma Hodgkin o no Hodgkin, según corresponda y los de tejidos blandos, respectivamente (92).

Este protocolo recoge los patrones de Gleason para describir los especímenes procedentes de biopsia con aguja, de resecciones transuretrales (TURP), de enucleaciones (prostatectomías parciales) y de prostatectomías

radicales. Además incluye la clasificación de estadio patológico (pTNM) de la octava edición del manual de estadificación de la AJCC.

1.2.5.8.1.1 TNM y agrupaciones de estadios

Los componentes de la clasificación pTNM quedan recogidos en las tablas 1-4. El protocolo recomienda el uso del sistema de estadificación TNM para el carcinoma de próstata del AJCC.

Tumor (pT)

Por convención AJCC, la designación "T" se refiere a un tumor primario que no ha sido tratado previamente. El símbolo "p" se refiere a la clasificación patológica del TNM, a diferencia de la clasificación clínica, y se basa en el examen macroscópico y microscópico. pT implica una resección del tumor primario o una biopsia adecuada para evaluar la categoría pT más alta, pN implica la eliminación de los ganglios adecuados para validar la metástasis ganglionar y pM implica el examen microscópico de las lesiones distantes. La clasificación clínica (cTNM) generalmente es llevada a cabo por el médico clínico remitente antes del tratamiento, durante la evaluación inicial del paciente, o cuando la clasificación patológica no es posible.

La estadificación patológica generalmente se realiza después de la resección quirúrgica del tumor primario y depende de la documentación anatomopatológica sobre la extensión anatómica de la enfermedad, haya sido eliminado por completo o no el tumor primario. Si un tumor sometido a biopsia

no se reseca por alguna razón (por ejemplo, cuando es técnicamente inviable), y si las categorías T y N son las más altas o la categoría M1 del tumor puede confirmarse microscópicamente, los criterios de clasificación patológica y estadificación se han cumplido sin que se haya eliminado completamente el cáncer primario. El tumor confinado a la glándula prostática independientemente de la cantidad y distribución se considera pT2, pT3a y pT3b.

Nódulos linfáticos regionales y distantes

Nódulos linfáticos regionales

Los ganglios linfáticos regionales son los ganglios de la pelvis verdadera, que son esencialmente los nódulos pélvicos debajo de la bifurcación de las arterias ilíacas comunes. Incluyen los siguientes grupos ganglionares:

- Pélvico, NOS
- Hipogástrico
- Obturador
- Ilíaco (interno, externo o NOS)
- Sacral (lateral, presacro, promontorio [de Gerota] o NOS)

Nota: La lateralidad no afecta la clasificación N.

Nódulos linfáticos distantes

Los ganglios linfáticos distantes se encuentran fuera de los confines de la verdadera pelvis. Se pueden obtener imágenes con ultrasonido, tomografía computarizada, resonancia magnética o linfangiografía. Aunque los ganglios linfáticos agrandados se pueden visualizar ocasionalmente en imágenes radiográficas, inicialmente se descubren menos pacientes con enfermedad metastásica clínicamente evidente. En pacientes de menor riesgo, las pruebas

de imagen han demostrado ser inútiles. En lugar de imágenes, las tablas de riesgos se usan muchas veces para determinar el riesgo individual de compromiso ganglionar del paciente antes del tratamiento. La participación de los ganglios linfáticos distantes se clasifica como M1a. Las localizaciones ganglionares distantes son las siguientes:

- Aórtica (lumbar paraaórtica)
- Ilíaca común
- Inguinal, profundo
- Inguinal superficial (femoral)
- Supraclavicular
- Cervical
- Escalenos
- Retroperitoneal, NOS

En las tablas 3-6 se sistematizan los distintos componentes de la clasificación pTNM para la estadificación del CPR.

Tabla 3. Tamaño del tumor primario anatomopatológico (pT). Modificado de Pathologic Stage Classification (pTNM, AJCC 8th Edition).

Tamaño del tumor primario (pT)	
pT2	Tumor órgano confinado
pT3	Extensión extraprostática
pT3a	Extensión extraprostática (unilateral o bilateral) o invasión microscópica del cuello vesical.
pT3b	Invasión tumoral de la/s vesícula/s seminal/es
pT4	El tumor fija o invade estructuras adyacentes distintas a las vesículas seminales tales como: el esfínter externo, el recto, la vejiga urinaria, los músculos elevadores y/o la pared pélvica.
Nota 1: No existe la clasificación anatomopatológica T1. Nota 2: La afectación de los márgenes quirúrgicos se debe indicar en el descriptor R1 que significa enfermedad microscópica residual.	

Tabla 4. Afectación de los ganglios regionales anatomopatológico (pN). Modificado de Pathologic Stage Classification (pTNM, AJCC 8th Edition).

Afectación de ganglios regionales (pN)	
pNX	Los linfáticos regionales no han podido evaluarse.
pN0	Los ganglios regionales no están afectados.
pN1	Metástasis en ganglio/s regional/es

Tabla 5. Metástasis a distancia. Categorización anatomopatológica (pM). Modificado de Pathologic Stage Classification (pTNM, AJCC 8th Edition).

Metástasis a distancia (pM)	
pM1	Metástasis a distancia
pM1a	Metástasis en ganglios NO regionales
pM1b	Metástasis óseas
pM1c	Metástasis en cualquier otra localización con o sin afectación ósea
	Especificar la/s localización/es, si se conoce: _____
Nota 1: Cuando existen más de una metástasis a distancia indicar la categoría que se considere más avanzada, siendo M1c la categoría más avanzada.	

Tabla 6. Otros hallazgos anatomopatológicos de interés. Modificado de Pathologic Stage Classification (pTNM, AJCC 8th Edition).

Resultados patológicos adicionales (indicar todos los que correspondan)
No se ha identificado ninguno
Neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN)
Inflamación (especificar el tipo): _____
Hiperplasia adenomatosa atípica (adenosis)
Hiperplasia nodular prostática
Otros (especificar): _____

1.2.6 Epidemiología

El CPr constituye un problema de salud relevante debido a su elevada incidencia, y prevalencia. Y aunque no tiene una mortalidad tan elevada como otros tumores, la morbilidad asociada a sus tratamientos genera una importante carga sanitaria y social.

Para la elaboración de este apartado se ha revisado la bibliografía científica más relevante, y los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística (INE), por el Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III, y por los grupos cooperativos EUROCORE (EUROCORE-5) y REDECAN (Red Española de Registros de Cáncer). Las estimaciones presentadas se realizan a partir de los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) mediante la plataforma *The Global Cancer Observatory* (GCO), que reúne los esfuerzos de los distintos proyectos de la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) entre los que se encuentran GLOBOCAN, *Cancer Incidence in Five Continents* (CI5); además de *Cancer Survival in Africa, Asia, the Caribbean and Central America* (SurvCan) y a partir de los datos que proyecta el Observatorio del Cáncer de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC)(163).

1.2.7 Etiología

Existe una evidencia limitada en la relación entre los siguientes agentes y el desarrollo de un CPr:

- 1) Esteroides (anabolizantes) androgénicos
- 2) Arsénico y los compuestos de arsénico inorgánico

- 3) Cadmio y compuestos de cadmio.
- 4) Malatión
- 5) Industria productora de caucho
- 6) Torio-232 y sus productos de degradación
- 7) Radiación X y radiación gamma
- 8) Hábitos alimentarios: se han relacionado con el CPr la alimentación rica en grasas saturadas, lácteos, etc., aunque existe controversia en este sentido.
- 9) Consumo de alcohol y tabaco

1.2.8 Incidencia

Se estima que en 2018 en Europa, la incidencia de cáncer fue de 3,91 millones de casos (excluyendo el cáncer de piel no melanoma) y que se producirán 1,93 millones muertes por cáncer.

El CPr es el cuarto cáncer más común en ambos sexos y el segundo cáncer más común en los hombres. Se estima que 1,1 millones de hombres en todo el mundo fueron diagnosticados de CPr en 2012, representando el 15% de los cánceres diagnosticados en los hombres. Casi el 70% de los casos (759.000) se produjeron en las regiones más desarrolladas del planeta. La incidencia de CPr varía más de 25 veces en todo el mundo; las tasas son más altas en Australia-Nueva Zelanda y América del Norte, siendo las tasas ajustadas por edad (ASR) de 111,6 y 97,2 por 100.000, respectivamente, y en Europa Occidental y del Norte, debido a la generalización de la determinación en suero del PSA en estas regiones. Las tasas de incidencia son también relativamente altas en ciertas regiones menos desarrolladas, como el Caribe (79,8), el sur de África (61,8) y Sudamérica (60,1), pero siguen siendo bajos en las poblaciones

de Asia con tasas estimadas de 10,5 y 4,5 en la región del este y la región sur-central de Asia, respectivamente.

Aunque el CPr es el segundo cáncer más común en hombres en todo el mundo, en Europa y en España ha sido, durante algunos años, el primero en número de diagnósticos (345.000 en la EU-28 en 2012 y 33.370 en España en 2015).

Se estima que en 2015, se diagnosticaron 247.771 nuevos casos de cáncer invasor en España (148.827 en hombres y 98944 en mujeres). Los 5 tumores más frecuentes fueron el cáncer colorrectal (CCR; 41.411 casos), CPr; (33.370 casos), CPu (28.347 casos), CMa (27.747 casos) y vejiga urinaria (CVU; 21.093 casos) (164).

El análisis por género puso de manifiesto que el CPr es el cáncer invasor más frecuente en el hombre, por delante del CCR (24.764 casos), del CPu (22.430 casos) y del CVU (17.439 casos). Entre estos cuatro tumores constituyen el 66% de los tumores invasores en hombres (164).

Una publicación reciente de Ferlay et al., que resume la incidencia y mortalidad por cáncer en Europa para 2018, estima que en este año se diagnosticarán unos 3,91 millones de casos nuevos de cáncer (excluido el cáncer de piel no melanoma) y que el número de muertes por esta causa será de 1,93 millones. También estima que el CPr, con 449.800 casos, ocupará el cuarto lugar en orden de frecuencia por localización; siendo el primero el CMa con 523.000 casos, seguido del CCR con 500.000 y después por el CPu con 470.000 casos. En el hombre el CPr ocupa la primera posición en cuanto a la incidencia, seguido

del CPu (311.800 casos) y del CCR (271.600 casos) (165) (Ilustración 3) (tabla 6).

La incidencia del CPr está asociada a la edad de los pacientes, de tal manera que a medida que el hombre se acerca al final de la década de los 70-80 años, el riesgo de padecer una CPr alcanza su valor máximo (11,1%), seguido del CPu (8,8%). En el estudio de tendencias 2003-2007 se aprecia esta asociación entre la incidencia del CPr y la edad del paciente (figura 1).

La estimación de tasas de incidencia ajustadas por edad a la población estándar europea (ASIRe) para 2012 en la población española fue ligeramente inferior a la de la media europea (UE-27) (103,4 frente a 110,8) (164,166) (tabla 7).

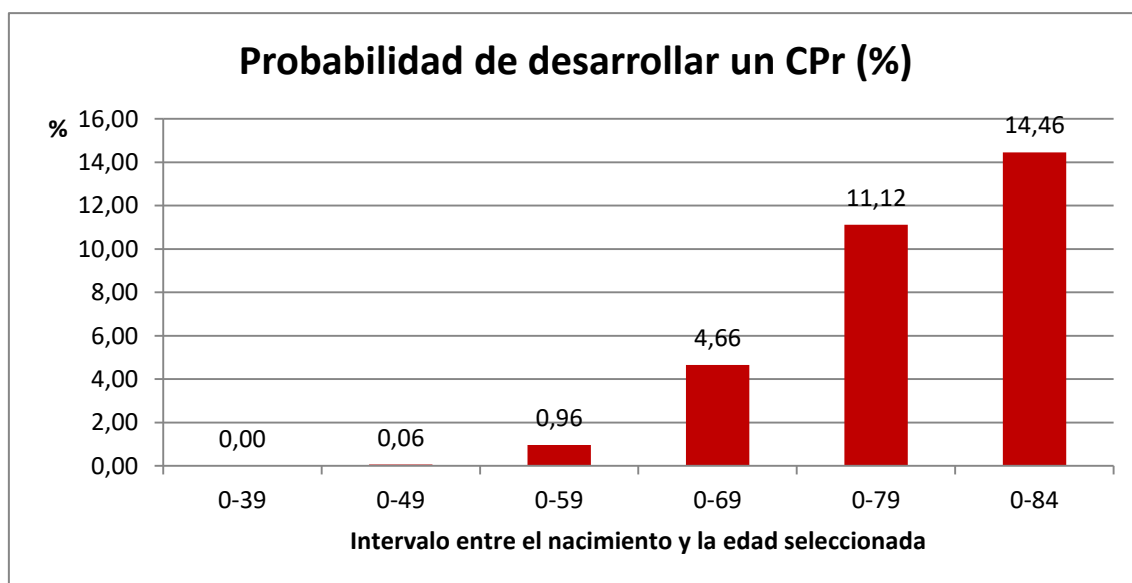


Figura 1. Probabilidad de desarrollar un CPr invasor entre el momento del nacimiento y la edad seleccionada. Modificado de Galcerán et al, 2015.

En la tabla 6 se presenta una comparativa de la incidencia en distintas áreas geográficas en 2012 y 2018.

Tabla 7. Comparativa de la incidencia entre áreas geográficas y años 2012 y 2018

Estimaciones de Incidencia	España		Unión Europea (EU-28)		OMS Europa (EURO)		Mundial
	2012	2018	2012	2018	2012	2018	2012
Número de caso nuevos	27.853	31.730	345.195	345.195	400.364	449.760	1.094.916
Tasas brutas	120,5	120,5	139,0	139,0	112,0	112,0	30,8
Tasas ajustadas ASIRe		104,2				92,5	
Tasas ajustadas ASIRw	65,2	73,1	70,4	70,4	61,3	62,1	30,6
Riesgo acumulado	8,6		9,1	9,1	7,9		3,8
Datos ECIS European Cancer Information System (Comisión Europea), IARC y Globocan							

En España, como en muchos países occidentales, la incidencia ha aumentado drásticamente desde principios de la década de 1990 debido a la introducción y el uso generalizado de la prueba del PSA (167). Se estima que en España las ASIRe aumentaron de 54,1 en 1993-1997 a 96,4 en 2003-2007. En período 2008-2015, las tasas de incidencia para la población española ajustadas por edad a la población estándar mundial ASIRw variaron desde 53,0 en Albacete a 83,4 en Mallorca (168) y estas diferencias son, sobre todo debidas, la consecuencia del diferente grado de uso de la prueba de PSA más que a diferencias reales en la incidencia (164).

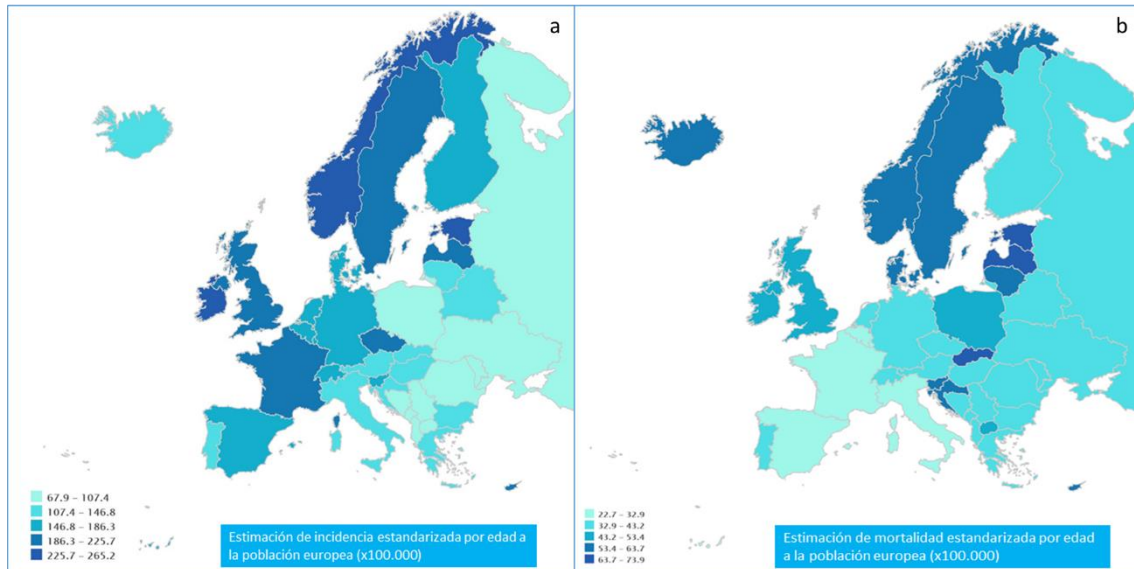


Ilustración 3. Mapa de distribución de CPPr por países europeos. Tasas de incidencia (a) y mortalidad (b) estimadas ajustadas por edad a la población europea. Modificado de ECIS European Cancer Information System (Comisión Europea) disponible: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>.

El CPPr presenta una fuerte relación con la edad, con una incidencia creciente después de los 50 años, y la edad constituye el principal factor de riesgo para este tipo de cáncer. En 5-10% de los casos, se ha encontrado un componente hereditario en las agregaciones familiares. También se han observado mutaciones en los genes BRCA1/BRCA2 (mayor riesgo de CMA, cáncer de páncreas y CPPr) y en los genes p53 y CHEK2 (síndrome de Li-Fraumeni) (169–171). Parece que hay un aumento moderado del riesgo de este cáncer en fumadores de larga evolución, y ciertos factores nutricionales (172), aunque aún existe cierta controversia.

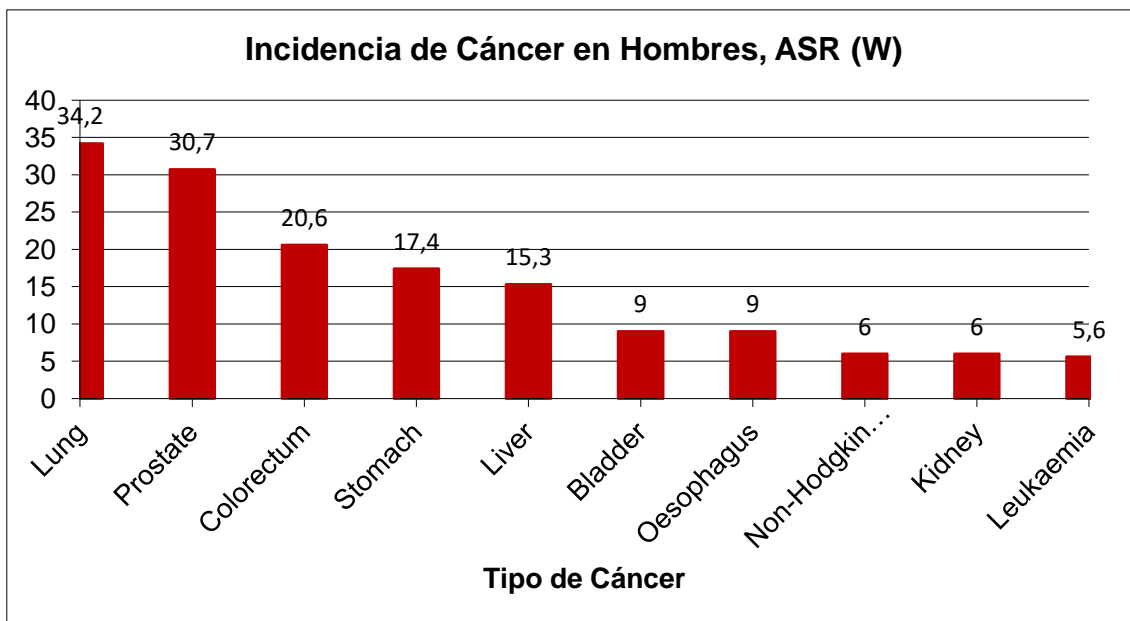


Figura 2. Incidencia de cáncer en hombres a nivel mundial en 2012 (ASR (W): razón estandarizada por edad referida a la población mundial)

NOTA: la tasa estandarizada por edad (ASR) es una medida resumida de la tasa que tendría una población determinada si tuviese una estructura de edad estándar. La estandarización es necesaria cuando se comparan varias poblaciones que difieren con respecto a la edad porque la edad tiene una poderosa influencia sobre el riesgo de cáncer. La ASR es una media ponderada de las tasas específicas por edad; los pesos están dados por la distribución de población de una población estándar. La población estándar utilizada con mayor frecuencia es la población estándar mundial. La incidencia o tasa de mortalidad calculada se denomina incidencia estandarizada por edad o tasa de mortalidad (mundial). También se expresa por 100.000. Tomado de: <http://eco.iarc.fr/eucan/Glossary.aspx>

Dos factores han estado involucrados en las tendencias temporales en la incidencia y mortalidad del CPR. Por un lado, se ha producido un aumento real

de la incidencia debido al aumento de exposición a uno o más factores de riesgo, y por otro al aumento de la capacidad de detección de casos asociados a la introducción de nuevas técnicas diagnósticas y terapéuticas, como la resección transuretral (TURP) y, sobre todo, la prueba de PSA. El uso de PSA ha tenido un impacto dramático en las tendencias de incidencia en muchos países, pero también ha producido efectos indeseables como el sobrediagnóstico. La velocidad en la propagación de la prueba de PSA en España fue más lenta que en otros países y es imposible conocer su impacto en las tendencias de las tasas de incidencia específicas de cada etapa.

1.2.9 Mortalidad

El adenocarcinoma de próstata es la forma más frecuente de cáncer en los hombres, siendo responsable del 27% de los cánceres en EEUU en 2014, Durante las últimas décadas, la mortalidad por CPr se ha reducido de forma significativa, de tal forma que en la actualidad, sólo provoca un 10% de todas las muertes por cáncer en EE.UU (19).

Con un número estimado de 307.000 muertes en 2012, el CPr constituye la quinta causa de muerte por cáncer en los hombres (6,6% del total de muertes en hombres) (tabla 7). Debido a que la determinación del PSA tiene un efecto mucho mayor sobre la incidencia que sobre la mortalidad, hay menos variación en las tasas de mortalidad en todo el mundo (diez veces aproximadamente de 3 a 30 por 100.000) que la que se observa en la incidencia. El número de muertes por CPr es mayor en las regiones menos desarrolladas que en las más desarrolladas (165.000 y 142.000, respectivamente). Las tasas de mortalidad son generalmente más altas en poblaciones predominantemente de raza negra

(Caribe, 29 por 100.000 y el África subsahariana, 19-24 por 100.000), muy baja en Asia (2,9 por 100.000 en el Sur y Centro, por ejemplo) e intermedia en el continente americano y Oceanía.

La mortalidad por CPr no se afecta tanto por el diagnóstico precoz de individuos asintomáticos como por la supervivencia y la incidencia. La supervivencia es significativamente mayor en los países con alta incidencia (80% en EEUU frente al 40% en países en vías de desarrollo). Este pronóstico favorable puede deberse en gran medida a la detección en estadios precoces de este tumor.

El estudio publicado por Ferlay et al., estima que la mortalidad por cáncer en Europa para 2018 afectará 1,078 millones de hombres y que de ellos, 107.300 (10%) lo harán por CPr. También estima que el CPr será la tercera causa de muerte en este sexo; siendo el primero el de pulmón con 267.300 (24,8%) casos y el segundo el colorrectal con 129.700 (12,0%) casos. (165) (Ilustración 3).

1.2.10 Prevalencia

La Sociedad española de Oncología Médica (SEOM) ha publicado en su informe de 2018 que, según los datos comunicados por GLOBOCAN, la prevalencia a 5 años de CPr en el mundo en 2012 fue de 3.857.500 casos. Lo que lo convirtió en el segundo cáncer en orden de frecuencia detrás del cáncer de mama (6.232.108 casos) y por delante del colorrectal (3.543.582) y del de pulmón (1.893.078) (163).

Usando los datos de Globocan 2012 desglosados por edad y sexo y extrapolados a los datos de la población española para 2017 (INE), la SEOM ha

publicado una estimación de la prevalencia a 5 años para el CPr en España para el año 2017. El número de hombres afectados por el CPr en nuestro país para 2017 fue de 101.781 casos (163) (tabla 8).

La prevalencia se encuentra determinada por la supervivencia, es decir la prevalencia es más elevada en los tumores con mayor supervivencia; mientras que los tumores con supervivencia más cortas tienen una menor prevalencia aunque se diagnostiquen más frecuentemente.

Debido a su alta prevalencia, y de acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), los tumores constituyen una de las principales causas de ingreso hospitalario. En 2015 los tumores provocaron la tercera causa de estancia hospitalaria (3.599.306 estancias), por detrás de las enfermedades del aparato circulatorio (4.766.949 estancias) y respiratorio (3.886.462). Los ingresos provocados por tumores se mantuvieron relativamente estables con respecto a años anteriores (variación anual + 0,3) (163).

El riesgo de padecer CPr se incrementa progresivamente con la edad. La incidencia del cáncer sintomático es baja hasta los 50 años y aumenta exponencialmente a partir de esta edad.

Tabla 8. CPr. Estimaciones (x1000) sobre incidencia, mortalidad y prevalencia por regiones de la OMS en 2012. Modificado de OMS.

Regiones, estimaciones (x1000)	Incidencia	Mortalidad	Prevalencia (5 años)
Mundial	1095	307	3858
Regiones más desarrolladas	742	142	2871
Regiones menos desarrolladas	353	165	987
OMS_África (AFRO)	52	37	135
OMS_América (PAHO)	413	85	1539
OMS_Mediterraneo Oriental (EMRO)	19	12	47

Regiones, estimaciones (x1000)	Incidencia	Mortalidad	Prevalencia (5 años)
OMS_Europa (EURO)	420	101	1513
OMS_Sudeste Asiático (SEARO)	39	25	123
OMS Pacífico Occidental (WPRO)	153	46	499
Miembros de la IARC (24 países)	791	157	2998
Estados Unidos	233	30	980
China	47	23	104
India	19	12	64
Unión Europea (EU-28)	345	72	1277

1.2.11 Supervivencia

La Comisión Europea ha publicado en la plataforma del Sistema de información Europeo del Cáncer (ECIS, en sus siglas en inglés) los datos relacionados con la supervivencia por rango etario, que se expresan en supervivencia observada en % y supervivencia relativa.

La tabla 9 muestra el número de pacientes hombres de 15 años o más años de edad diagnosticados entre 2000-2007 con CPr en España y presenta la supervivencia observada y la supervivencia relativa a uno, tres y cinco años después del diagnóstico. El número de casos y la supervivencia se expresan por grupos de edad en el momento del diagnóstico y para todas las edades adultas juntas. Las estimaciones de supervivencia observada y de supervivencia relativa para todos los adultos están estandarizadas por edad. La estandarización de la edad se realiza con el método directo utilizando ponderaciones específicas del cáncer obtenidas de los Estándares Internacionales de Supervivencia al Cáncer (ICSS). La supervivencia relativa es un indicador estándar para comparar la supervivencia del cáncer en estudios poblacionales cuando la causa subyacente de la muerte es desconocida. La supervivencia relativa es la relación entre la

supervivencia observada de los pacientes y la supervivencia esperada en un grupo comparable en la población general para la misma región, edad, sexo y año calendario. Se puede interpretar como la probabilidad de supervivencia de pacientes con cáncer en ausencia de otras causas de muerte, que pueden variar ampliamente entre países. En el estudio EUROCORE-5, la supervivencia esperada se estimó mediante el método Ederer II a partir de las tablas de mortalidad de todas las causas por edad, sexo, registro de cáncer y año calendario. La supervivencia relativa de los pacientes diagnosticados en 2000-2007 y seguidos hasta 2008 se estimó utilizando el enfoque de cohortes clásico. La supervivencia relativa se estandarizó por edad utilizando los Estándares Internacionales de Supervivencia al Cáncer (ICSS). La supervivencia relativa media europea se estimó ponderando la supervivencia relativa específica del país por la población del país (tabla 10).

Tabla 9. Supervivencias observadas y relativas (%) de España en el periodo 2000-2007. Datos procedentes del ECIS European Cancer Information System (Comisión Europea) disponible: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>

Grupo de edad	Número de casos	Tipo estimación	1 año	3 años	5 años
ICSS-Std	18418	obs	92.04	80.82	72.07
		rel	95.04	88.84	84.59
15+	18418	obs	91.10	78.49	68.63
		rel	94.82	88.57	84.48
15-54	544	obs	97.42	92.33	87.38
		rel	97.91	93.81	89.93
55-64	3224	obs	97.17	91.04	85.59
		rel	98.19	94.14	90.89
65-74	8166	obs	94.68	85.09	76.85
		rel	97.07	92.26	88.93
75-84	5486	obs	86.67	68.27	54.04
		rel	92.13	83.36	77.68
85+	998	obs	63.09	32.70	17.82
		rel	75.19	57.31	49.07

ICSS-Std: La supervivencia relativa se estandarizó por edad utilizando los Estándares Internacionales de Supervivencia al Cáncer (ICSS). Obs: supervivencia observada; Rel: supervivencia relativa es un indicador estándar para comparar la supervivencia del cáncer en estudios poblacionales cuando la causa subyacente de la muerte es desconocida.

Tabla 10. Comparativa entre las supervivencias observadas (%) de España y Europa en el periodo 2000-2007. Datos procedentes del ECIS European Cancer Information System (Comisión Europea) disponible: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>.

Grupo de edad	Supervivencia España (%)	Supervivencia Media Europea (%)
15-54	89,93	85,65
55-64	90,89	89,91
65-74	88,93	88,11
75-84	77,68	76,66
85 ó más	49,07	54,19

1.4 La SP y el receptor NK-1R

1.4.1 Generalidades de la SP/NK-1R

La SP es uno de los neuropéptidos (NP) mejor caracterizados en los tejidos de mamíferos. Es un polipéptido de cadena corta perteneciente a la familia de las taquicininas (TK). SP está constituida por once aminoácidos, de los que los seis correspondientes al extremo C-terminal son esenciales para su actividad biológica, ya que forman parte del sitio de unión a su receptor específico, conocido como receptor de la neuroquinina 1 (NK-1R). Las evidencias existentes señalan que la SP actúa a nivel del sistema nervioso central como neurotransmisor y neuromodulador (173).

SP está ampliamente distribuida por toda el organismo, por lo que es posible localizarla en el sistema nervioso central y en el periférico, tanto en humanos como animales vertebrados e invertebrados.

Según numerosos estudios, la SP desempeña un papel relevante en la progresión neoplásica, objeto de nuestro estudio. Se ha descrito que el sistema SP/NK-1R muestra un grado de sobreexpresión variable y que ejerce una acción mitogénica y antiapoptótica. Estas funciones las realiza mediante 4 vías distintas (ilustración 4) (174): la vía nerviosa (la central dependiente del sistema límbico y la periférica), la autocrina, en la que la propia célula tumoral estimula o induce su propia mitogénesis, la paracrina, en la que la célula tumoral mediante la acción de la SP induce la proliferación de células adyacentes, incluidas las células endoteliales y la endocrina en la que la masa tumoral, en conjunto, se comporta como si fuese un órgano endocrino manteniendo unas concentraciones plasmáticas más o menos elevadas de SP que harán sus

funciones a distancia. Recientemente, se ha descrito la función autocrina (175–177), que quizás debería llamarse nucleocrina (177–179) (ya que la función no la realiza en el citoplasma ni en sus orgánulos sino en el núcleo), en la que NK-1R ingresa en el núcleo para ejercer una función que aún no es del todo conocida (180).

La SP tiene función nociceptiva, espasmogénica, hipotensora, sialagoga; está involucrada en el edema y broncoconstricción y es el mayor mediador de la inflamación neurogénica.

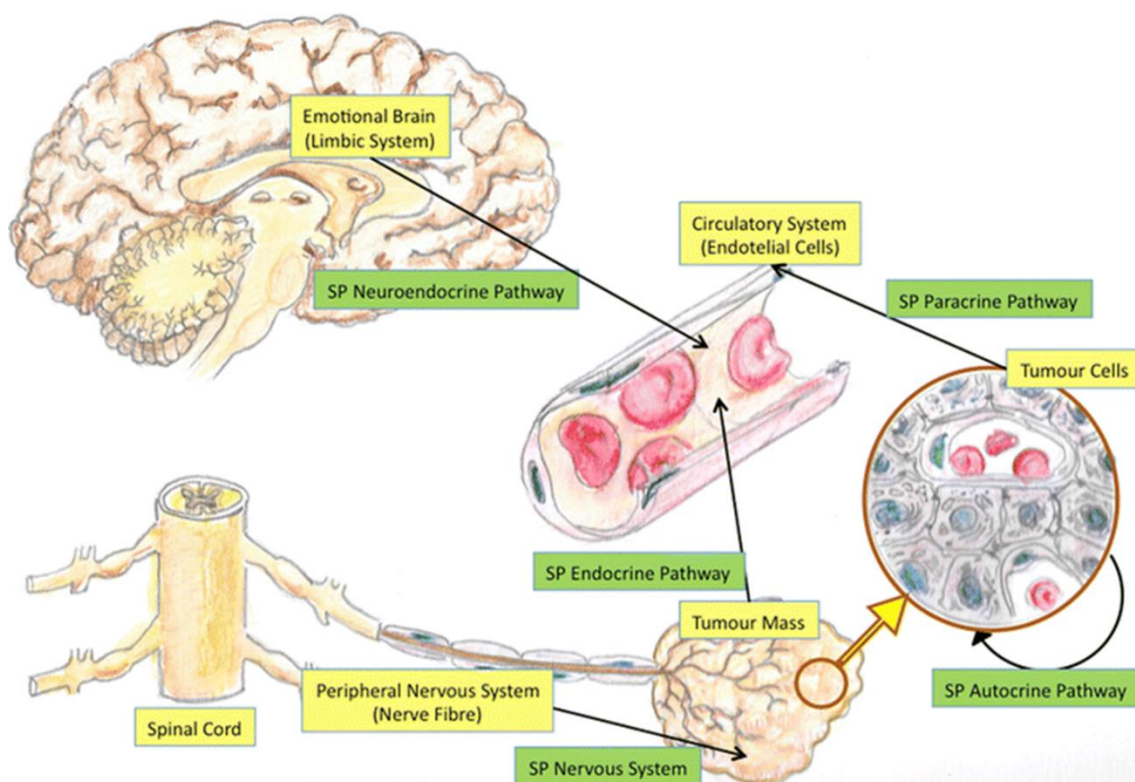


Ilustración 4. Vías de acción de la SP (Tomado de Muñoz M, Coveñas, R, Esteban F, y Redondo M; 2015).

1.4.1.1 Breve reseña histórica

Para comprender el papel que juega la SP hay que hacer un breve recorrido por los hitos históricos más relevantes y reconocer el valor de los científicos que nos llevaron hasta el conocimiento de los neuropéptidos y su papel fisiopatológico.

Aunque nuestros conocimientos actuales sobre el sistema nervioso son el resultado del trabajo de un gran número de científicos, Nuestro equipo de investigación reconoce el papel fundamental que nuestro compatriota y Premio Nobel de Medicina D. Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) significó para el desarrollo de la Neurociencia. Sin el descubrimiento de la neurona como unidad fundamental del sistema nervioso y sin su descripción de la sinapsis hubiera sido muy difícil, por no decir imposible, el estudio de la acetilcolina y otros neurotransmisores como elementos fundamentales para la comunicación interneuronal y la transmisión del potencial de acción. Asimismo, los trabajos de Cajal supusieron la base para la creación de la atmósfera científica necesaria para dar origen a la neurociencia moderna (DeFelipe, 2002). Sus observaciones, junto con ilustraciones precisas, tuvieron un gran impacto no solo en los investigadores de su época, sino también en estudios modernos sobre la organización cortical (181). La teoría neuronal establece los principios fundamentales de la organización y función del sistema nervioso al afirmar que las neuronas son las unidades anatómicas, fisiológicas, genéticas y metabólicas del mismo.

Las terminaciones axonales de las neuronas presinápticas se continuaban con las terminaciones dendríticas de las neuronas postsinápticas mediante un

espacio físico que se denominó hendidura sináptica. La información recorre el sistema nervioso, tanto en sentido centrípeto como centrífugo a través de una sucesión de neuronas en forma de potenciales de acción o impulsos nerviosos. La comunicación de la señal entre una neurona y otra a través de la hendidura sináptica puede realizarse de dos formas distintas: la sinapsis eléctrica o la sinapsis química.

Las sinapsis eléctricas se caracterizan por la presencia de unos canales abiertos que conducen electricidad directamente de una célula a la siguiente, la mayoría de ellos a través de uniones en hendidura. En el SNC, no se han encontrado más que unos pocos ejemplos de este tipo de neurotransmisión.

Casi todas las sinapsis estudiadas en el SNC del ser humano son sinapsis químicas. En éstas, cuando un impulso eléctrico llega a la terminación presináptica mediante una serie de cambios en las concentraciones intra y extracelulares de iones sodio y potasio que a su vez generan alteraciones en las concentraciones de iones calcio a nivel intracelular y la activación de los fenómenos de transporte de vesículas que mediante un proceso de exocitosis segrega una sustancia química conocida como neurotransmisor a nivel de la hendidura sináptica. Este neurotransmisor actúa sobre las proteínas receptoras específicas presentes en la membrana de la neurona postsináptica desencadenando en ella un cambio en el potencial de acción de membrana que se transmitirá a lo largo de esta neurona. Según el neurotransmisor liberado y el receptor al que éste se una, las sinapsis químicas pueden ocasionar en la neurona postsináptica una excitación, inhibición o modificación de su sensibilidad en algún otro modo.

Actualmente se conocen más de 50 sustancias químicas para las que se ha comprobado o propuesto una acción neurotransmisora. Y es que para considerar una sustancia como neurotransmisora en sentido estricto, debe cumplir cuatro requisitos (182):

- a) Debe sintetizarse en la neurona.
- b) Debe estar presente en el terminal nervioso y liberarse en cantidades necesarias para ejercer su acción sobre la neurona postsináptica u órgano efector.
- c) Su administración exógena, en concentraciones apropiadas, debe provocar el mismo efecto que el obtenido cuando la sustancia se libera de forma endógena.
- d) Debe existir un mecanismo específico para eliminar la sustancia del espacio sináptico.

Existen diferentes clasificaciones de neurotransmisores. Una de las más aceptadas en la actualidad los divide en dos grandes grupos: los transmisores de acción rápida y molécula pequeña (neurotransmisores clásicos) y los neuropéptidos (NP) (tabla 11).

Tabla 11. Características diferenciales de los neuropéptidos y neurotransmisores clásicos.

Característica	Neurotransmisor clásico	Neuropéptido
Tipo de vesícula de almacenamiento	Pequeñas	Grandes
Vesículas dendríticas	No	Sí
Liberación dendrítica	No	Sí
Almacenaje cercano a la membrana sináptica	No	No
Disponibilidad dependiente de síntesis	No	Sí
Procesamiento de precursor	No	Sí

Característica	Neurotransmisor clásico	Neuropéptido
Concentración eficaz	10^{-9} a 10^{-10}	10^{-12} a 10^{-15}
Amplificación intracelular de la acción	No	Sí
Velocidad de eliminación de la hendidura sináptica	Rápida	Lenta

Los transmisores de acción rápida y molécula pequeña son los que producen las respuestas más inmediatas del sistema nervioso (p.e. la transmisión de las señales sensitivas hacia el encéfalo y de las señales motoras hacia los músculos). En cambio, los NP suelen provocar acciones más prolongadas, como son los cambios a largo plazo en el número de receptores neuronales, la apertura o el cierre duraderos de ciertos canales iónicos e incluso las modificaciones persistentes en la cantidad de sinapsis o su tamaño.

En 1929, Ulf Von Euler, farmacólogo de formación, comenzó a trabajar bajo las órdenes de Henry Dale. Por aquella época, la hipótesis de la neurotransmisión química estaba en discusión. Dale acababa de publicar que la acetilcolina podría tener una función neurotransmisora, y Euler comenzó sus investigaciones sobre la distribución de la acetilcolina en el tracto digestivo. Esta tarea la llevó a cabo utilizando un fragmento de intestino de conejo en un baño orgánico. Cuando sometía este fragmento a la acción de la acetilcolina conseguía un buen nivel de estimulación y por tanto de contracción de la fibra muscular lisa; y cuando exponía este mismo fragmento de tejido a la acción de la atropina se producía la reversión del efecto. Pero lo sorprendente fue que no se conseguía una reversión completa cuando se añadía la citada atropina. Así pues en 1931 se publica el primer artículo referente a la SP; en él se describía la

existencia en el cerebro y en el intestino de un factor resistente a la atropina que estimulaba el músculo liso y disminuía la presión sanguínea. Dicho factor fue denominado Sustancia P (SP). La P proviene de “*powder*” como referencia al polvo seco de acetona que quedaba en los extractos de tejido cerebral e intestinal de sus investigaciones.

Von Euler llevó a cabo descubrimientos tan importantes como la noradrenalina y las prostaglandinas. Pero, no fue hasta 1949 cuando Bengt Pernow, a las órdenes de Euler, retomó el trabajo sobre la SP consiguiendo su purificación, así como diversos datos acerca de su distribución y funciones biológicas (183). Pernow describió la distribución de la SP en el cerebro comprobando que los niveles eran mucho más altos en la sustancia gris que en la blanca; y que alcanzaba niveles altísimos en la sustancia negra mesencefálica, el diencéfalo y particularmente en el hipotálamo. A nivel de la médula espinal también demostró diferentes niveles de expresión según las áreas, así en la región dorsal las concentraciones de SP eran mayores que en la ventral. Además comprobó que la SP se expresaba también en los nervios periféricos, en especial a los nervios del sistema autónomo, los ganglios espinales y el tronco simpático. Este autor también demostró que en el tracto gastrointestinal, la capa muscular con su plexo nervioso mostraba una mayor concentración de SP que en el resto de las capas. Por último, comprobó que en niños con la enfermedad de Hirschprung, caracterizada por la ausencia total de células ganglionares en la parte distal rectosigmoidea manteniéndose intacta la proximal; la parte distal carecía por completo de SP, presentando una distribución normal en la proximal (184). Alrededor de esta fecha, en Australia,

Fred Lembeck publicó sus descubrimientos acerca de la función neurotransmisora sensitiva de la SP (185,186).

No fue hasta los principios de los 70 en Boston, cuando Susan E. Leeman y cols. identificaron la secuencia lineal de la SP, describiéndola como un undecapéptido (tabla 7) (187), siendo los primeros en sintetizar el compuesto (188) y llevar a cabo un ensayo radioinmunológico (189). Gracias a estas investigaciones, los efectos de la SP pudieron ser monitorizados en modelos fisiológicos (24,28,38,49–51,103,158,159,190–202). El modelo tridimensional de la SP puede verse en la ilustración 5.

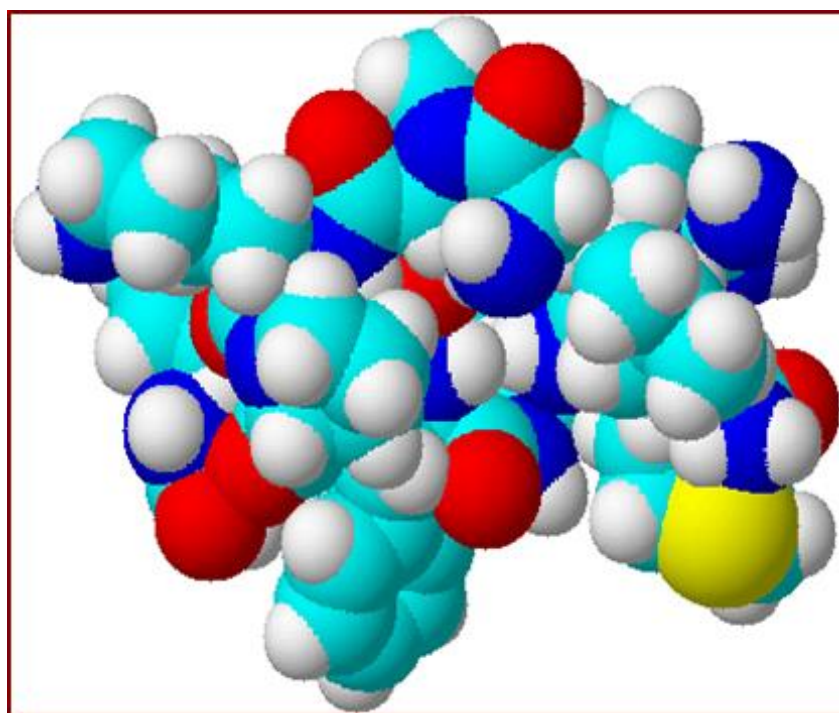


Ilustración 5. Modelo tridimensional de la sustancia P.

La SP ha sido una de las moléculas que más extensamente han sido estudiadas durante la última mitad del siglo pasado, pensándose además que

era la única TK hallada en mamíferos que actuaba como neuropéptido. Esto continuó así hasta 1983 cuando Kangawa y Kimura (203) descubrieron la Neurokinina A (NKA) y la Neurokinina B (NKB). Paralelamente, se describió la presencia de péptidos de esta familia de taquicininas en animales no mamíferos, como los invertebrados, de manera que las TK quedaban establecidas como una de las mayores familias de péptidos conocida hasta el momento con más de 40 miembros identificados en animales invertebrados (insectos, gusanos y moluscos), en procordados y en distintos órganos de los vertebrados (piel, tracto gastrointestinal, sistema nervioso, etc.) (tabla 12).

La primera TK identificada y caracterizada fue la SP y posteriormente, NKA y NKB que fueron identificadas en mamíferos entre 1983 y 1984 (203–206). Estos neuropéptidos, en general, se encuentran ampliamente distribuidos tanto por el sistema nervioso central (SNC) como periférico (SNP) y actúan principalmente como neurotransmisores. SP, en el sistema nervioso autónomo (SNA), actúa esencialmente como un neurotransmisor noradrenérgico no colinérgico (127,207–215). Recientemente, se ha demostrado que SP, NKA, NKB y otros miembros de las TK, incluida la Hemoquinina-1 (HK1), se producen también en células no neurales. Por tanto, las TK se distribuyen por toda la economía del organismo (216–223). Hasta la actualidad se han descrito seis TK en mamíferos: SP, NKA, NKB, NPK, NPY y la hemoquinina 1 (HK1) (187,224) (tabla 11). NPK y NPY son formas extendidas del segmento N-terminal de la NKA (141).

Tabla 12. Clasificación de los neuropéptidos.

CLASIFICACIÓN DE LOS NEUROPEPTIDOS			
FAMILIAS PEPTÍDICAS	OPIÁCEOS	Opiocortinas	ACTH α-MSH α, β y γ-Endorfinas
		Encefalinas	Metionina
			Metencefalina
			Leucina
			Leu-encefalina
		αDinorfinas	Dinorfina 1-8
			Dinorfina A (1-17)
			Dinorfina B
			Rinorfina
		Neoendorfinas	
	Otros péptidos opioides	Amida FMRF	
		Péptido E	
		Péptido F	
		BAM	
	NEUROHIPOFISARIOS	Vasopresina	
		Oxitocina	
		Neurofisina	
	SECRETINAS	Secretina	
		Glucagón	
		VIP	
		GIP	
PHI			
GHRF			
INSULINAS	Insulina		
	Relaxina		
	Somatomedina		
	NGF		
TAQUICININAS	Sustancia P (SP)		
	Sustancia K		
	Neuromedina K		
	Fisalemina		
SOMATOSTATINAS Y POLIPÉPTIDOS PANCREÁTICOS	Somatostatinas		
	Neuropéptido Y		
	Péptido Y		
GASTRINAS	pp pancreático avícola		
	Gastrina		
OTROS PÉPTIDOS de familias no definitivamente establecidas	HIPOFISARIOS	Colecistoquinina (CCK)	
		GH	
	HIPOTALÁMICOS	Lipotrofina	
		LHRH	
		TRH	
	HORMONAS CIRCULANTES	CRF	
		Angiotensina II	
	HORMONA DIGESTIVA	Calcitonina	
		Motilina	
	OTROS	Bombesina	
		Bradiquinina	
Carnosita			
Proctolina			
GRP			

Tabla 13. Secuencia lineal de las taquicininas.

ESTRUCTURA DE LAS TAQUICININAS	
SP	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
Hemokinina-1	Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
NKA	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
NKB	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
NPK	Asp-Ala-Asp-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Gln-Val-Ala-Leu-Leu-Lys-Ala-Leu-Tyr-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
NPγ	Asp-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
Kassinina	Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Gln-Phe-Val-Gly-Leu-MetNH ₂
Fisalemina	pGlu-Ala-Asp-Pro-Asn-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂
Ranakinin	Lys-Pro-Asn-Pro-Glu-Arg-Phe-Tyr-Gly-Leu-MetNH ₂
Eledoisina	pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-MetNH ₂

Estos péptidos se caracterizan por compartir la secuencia del extremo C-terminal: **Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂** (142-146) (tabla 13). Mientras que la secuencia de aminoácidos de la SP, NKA y NKB es idéntica en distintos mamíferos, la secuencia de HK1 parece variar entre el ratón, la rata y los humanos. En mamíferos, las taquicininas se expresan principalmente en los tejidos neurales (147-149). La SP y NKA están presentes tanto en el SNC como en el SNP, donde aparecen en los tejidos inervados por neuronas primarias aferentes sensibles a la capsaicina (118, 150-155), siendo liberadas en las terminaciones nerviosas de la médula espinal y los tejidos periféricos realizando una actividad excitatoria (156-159). Se ha puesto de manifiesto que la SP se expresa también en las células endoteliales humanas, las células de Leydig de ratón, diversas células inflamatorias e inmunes de humanos, ratas y ratones (160-163). También se ha demostrado la presencia de precursores del NKB en placentas humanas y de ratas, en úteros así como en otras células

reproductoras en ratón (164-167). Por último, la HK1 se expresa principalmente en células de estirpe no neural y se parece jugar un papel importante en la señalización intercelular, específicamente, en las comunicaciones entre el sistema nervioso y otros sistemas biológicos.

1.4.2 Neuropéptidos

Los NP se definen como péptidos neurotransmisores o neuromoduladores, lo que implica que son sintetizados y liberados por las neuronas y desencadenan una serie de efectos biológicos mediante la activación de una serie de receptores situados en la membrana plasmática de las células diana.

En general, los NP están constituidos por una cadena polipeptídica de 3 a 100 aminoácidos de longitud, lo que los hace hasta 50 veces más largos que los neurotransmisores clásicos como la acetilcolina; pero más cortos que otras proteínas y menos complejos desde el punto de vista de su estructura tridimensional (173). Los NP representan la clase más grande de neurotransmisores/neuromoduladores y presentan un alto grado de conservación desde el punto de vista evolutivo (225).

Los NP se distribuyen ampliamente por todo el organismo humano y están presentes tanto en las neuronas del SNC como del SNP (incluyendo las neuronas autónomas y las somatosensoriales).

Los NP conforman un grupo de neurotransmisores totalmente diferente a los neurotransmisores clásicos ya que se sintetizan de una forma distinta y desempeñan acciones diferentes. A partir de trabajos pioneros sobre la insulina

y lipotropina (168) se formuló la hipótesis de que estos péptidos derivaban de un largo precursor que se escindía enzimáticamente. Mediante estudios de secuenciación de aminoácidos, Schwartz y Costa en 1986 (169), descubrieron las denominadas poliproteínas, llamadas así porque sirven de precursor de más de un péptido biológicamente activo. Estas proteínas, también denominadas prohormonas, serán fraccionadas después por enzimas específicas en fragmentos más pequeños, formando de esta manera los NP que serán liberados posteriormente (170).

El concepto de “neurosecreción” o “neurona secretora” surgió gracias a las investigaciones de Scharrer (171) y de Bargmann (172-174) los cuales establecieron que existen neuronas que además de comportarse como las neuronas convencionales o colinérgicas, sintetizan enzimas o precursores peptídicos, almacenan la secreción en vesículas, la transportan axonalmente y las liberan, pudiendo además tener más de una secreción, lo que contradecía el principio de Dale. Estas secreciones son los neurotransmisores peptídicos.

A diferencia de los neurotransmisores clásicos, que son sintetizados en la región presináptica de la terminación nerviosa, y almacenados en vesículas hasta su utilización, los NP se sintetizan en los ribosomas del soma.

Los neuromoduladores son sustancias cuyas acciones se consideran reguladoras y actúan sobre grupos neuronales amplios de forma indirecta. Sin embargo hay NP que cumplen todos los criterios necesarios para ser considerados neurotransmisores y no sólo neuromoduladores y al revés, algunos neurotransmisores han demostrado también su actividad neuromoduladora en ciertas áreas cerebrales como por ejemplo la dopamina.

Actualmente, se realiza una clasificación más funcional de los mensajeros intercelulares desde el punto de vista de su estructura química en peptídicos y no peptídicos. Pertenecientes a este último grupo son: aminas (epinefrina, norepinefrina, dopamina, serotonina e histamina), acetilcolina y aminoácidos como glicina o glutamato.

En 1968, Bargmann et al. utilizan por primera vez el término de “**Neurona Peptidérgica**” para designar a aquellas neuronas que sintetizaban los octapéptidos, oxitocina y vasopresina, pues no sólo liberaban estas hormonas a la sangre sino que también formaban sinapsis sobre la superficie de otras células.

La existencia de péptidos en el interior de la célula nerviosa presenta una serie de peculiaridades diferenciales con respecto a las características de las neuronas que contienen neurotransmisores clásicos.

Tomando como ejemplo de neurotransmisor clásico a la noradrenalina, sus niveles se mantienen constantes por un eficiente mecanismo de reemplazamiento del neurotransmisor liberado, que comprende: síntesis enzimática en el terminal nervioso, recaptación por un fenómeno de transporte activo y suministro de amina o de sus precursores a los gránulos de almacenamiento procedentes del soma neuronal, vía transporte axonal.

En cambio, los péptidos sólo se originan en los ribosomas del soma celular en forma de precursores de gran tamaño molecular, sin que tenga lugar recaptación ni tampoco síntesis a nivel del terminal nervioso (Hökfelt T et al. 1980) (tabla 14 e ilustración 6).

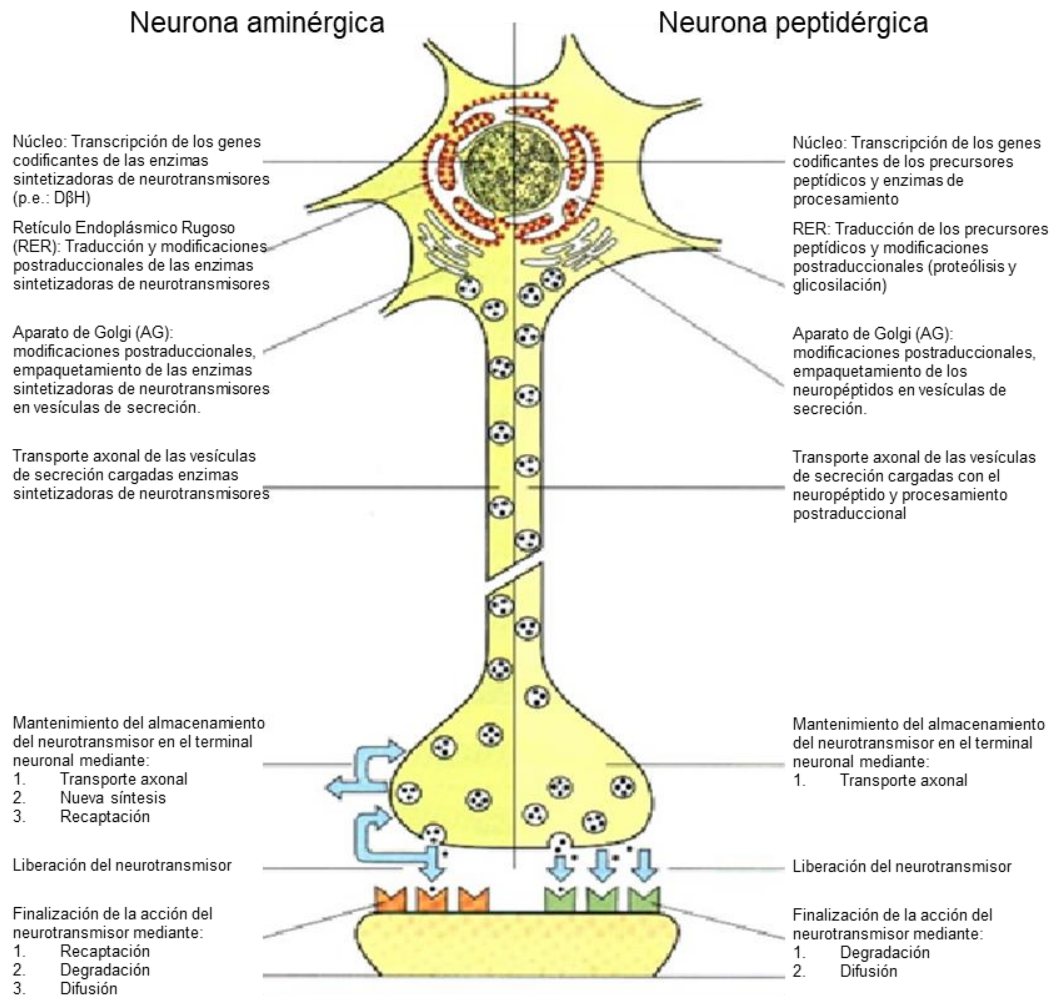


Ilustración 6. Diferencias entre las neuronas aminérgicas y peptidérgicas.

Este mecanismo, comparativamente menos eficaz, ha de reflejarse en la dinámica a nivel de la sinapsis peptidérgica (ilustración 6). Los péptidos se liberan intermitentemente en lugar de tónicamente. Posiblemente, tal liberación intermitente podría ser compensada por una acción comparativamente más duradera. Por otra parte, las cantidades liberadas de péptidos son menores que las de los transmisores clásicos. Este hecho estaría de acuerdo con las menores concentraciones encontradas para los péptidos en el sistema nervioso central

(mil veces menor que las monoaminas y cien mil veces menor que los aminoácidos).

Tabla 14. Diferencias entre la neurotransmisión mediante neurotransmisores clásicos y la neuropeptidérgica.

Característica	Neurotransmisor clásico	Neuropéptido
Tipo de vesícula de almacenamiento	Pequeñas	Grandes
Vesículas dendríticas	No	Sí
Liberación dendrítica	No	Sí
Almacenaje cercano a la membrana sináptica	No	No
Disponibilidad dependiente de síntesis	No	Sí
Procesamiento de precursor	No	Sí
Concentración eficaz	10^{-9} a 10^{-10}	10^{-12} a 10^{-15}
Amplificación intracelular de la acción	No	Sí
Velocidad de eliminación de la hendidura sináptica	Rápida	Lenta

Los NP pueden activar receptores a concentraciones mucho más bajas que los neurotransmisores primarios, una situación que podría compensar el mecanismo de renovación menos eficaz de los péptidos y con una duración más larga debido a una disociación lenta con el receptor específico con el que tiene una afinidad diez mil veces mayor que los neurotransmisores clásicos (226).

Con posterioridad a la formación del precursor del péptido a nivel ribosomal, la molécula es almacenada en vesículas que son transportadas al terminal donde son finalmente procesadas por endo o exopeptidasas situadas probablemente en la membrana de las vesículas, siendo liberado el péptido, producto final de esa biosíntesis, por acción de los iones durante la fase de despolarización.

Aparentemente, no es la biosíntesis ribosomal la que es susceptible de regulación por la actividad neuronal, sino precisamente el proceso catalítico final de liberación del péptido activo por acción de la peptidasa (227).

En los casos en que el péptido neurotransmisor potencial contiene una modificación del grupo carboxílico terminal: grupo amida (SP) o del grupo amino (neurotensina), las enzimas correspondientes han de estar localizadas en el terminal nervioso, estando reguladas posiblemente por aquellos iones que entran en la célula durante el proceso de actividad neuronal.

Por lo que respecta al proceso de inactivación, mientras que para catecolaminas y serotonina la recaptación por el terminal es el mecanismo más eficiente, en el caso de los péptidos, una vez que se liberan y actúan a nivel del receptor, aparentemente su vía primordial de inactivación consiste en la degradación por peptidasas.

Van a existir diferencias entre los neurotransmisores clásicos y la utilización de un NP por una célula nerviosa como neurotransmisor. La utilización de una monoamina se va a diferenciar en aspectos tan fundamentales como son la forma en que la célula sintetiza la sustancia, su almacenaje y su mecanismo de acción (228).

Para **clasificar un péptido como neurotransmisor** potencial, ha de cumplir una serie de requisitos, ya establecidos para definir a los neurotransmisores clásicos:

- Mecanismos especializados en la neurona para la síntesis del neurotransmisor. Y debe existir un mecanismo específico para eliminar la sustancia del espacio sináptico.

- Debe estar presente en el terminal sináptico y liberarse en concentraciones relativamente altas para ejercer su acción sobre la neurona postsináptica u órgano efector.
- Su administración exógena, en concentraciones apropiadas, deben provocar el mismo efecto que el obtenido cuando la sustancia se libera de forma endógena.
- Liberación del péptido por estímulos despolarizantes dependientes de Ca^{2+} , ha de modificar la excitabilidad eléctrica de neuronas aisladas.
- La acción de un antagonista debe bloquear las respuestas desencadenadas por el neurotransmisor potencial o por la estimulación nerviosa.

Aunque existen aún muchas incógnitas sobre algunas de las sustancias consideradas como NP, sólo algunas cumplen todos los criterios para ser consideradas como verdaderos neurotransmisores. Las que cumplen con certeza los requisitos son: encefalinas, neurotensina, LHRH y la SP, objeto de nuestro estudio.

1.4.2.1 Biosíntesis de los neuropéptidos

En 1971, Chang, Leeman y Niall (101); describen la estructura de este undecapéptido en hipotálamo de vaca. Estos autores concluyen que SP está constituida por la siguiente secuencia: H-Arg¹-Pro²-Lys³-Pro⁴-Gln⁶-Phe⁷-Phe⁸-Gly⁹-Leu¹⁰-Met¹¹-NH₂. Casi una década más tarde, se incluyó la SP dentro de la familia de las TK (175), junto a NKA y a la NKB que tienen en común el extremo carboxilo-terminal (Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂), en la que X puede ser sustituido por fenilalanina o valina (118). Según Lavielle et al. y Regoli et al. (127, 176), la

conformación tridimensional de la SP depende del solvente usado y del ambiente lipídico en el que se encuentre el péptido, pudiendo adoptar una conformación en β -hélice cuando se extrae en metanol o una estructura en cadena extendida cuando está disuelta en agua (177). Los análisis mediante espectroscopía con resonancia nuclear magnética ponen de manifiesto una estructura en α -hélice entre la prolina 4 y la fenilalanina 8 estabilizada por dos puentes de hidrógeno entre la fenilalanina 7 y la lisina 3 y otro entre la fenilalanina 8 y la prolina 4. Presenta además una región NH₂ terminal muy flexible que engloba desde la arginina 1 a la lisina 3. A nivel de la glicina 9 presenta un giro que permite el contacto entre las dos glutaminas mediante un enlace amida entre los átomos de oxígenos de los grupos γ -carboxilos (127, 176).

En los mamíferos, la SP se origina a partir del gen de la preprotaquicinina-A (PPT-A). Este gen codifica también para otras TK: neuroquinina A (NKA), neuropéptido K y neuropéptido γ (NP γ) (178). Las modificaciones postranscripcionales tipo corte y empalme alternativo de la PPT-A son las responsables de la formación de los tres ácidos ribonucleicos mensajeros (mRNA): α PPT-A, β PPT-A, γ PPT-A (178). Estas tres moléculas de mRNA codifican para la molécula precursora de la SP; mientras que sólo la α PPT-A y la β PPT-A codifican para la secuencia precursora de la NKA. NPK y NP γ son derivados amino-terminales de NKA que parecen ser productos finales del procesamiento postraduccional de α PPT-A y β PPT-A (179) (ilustración 7).

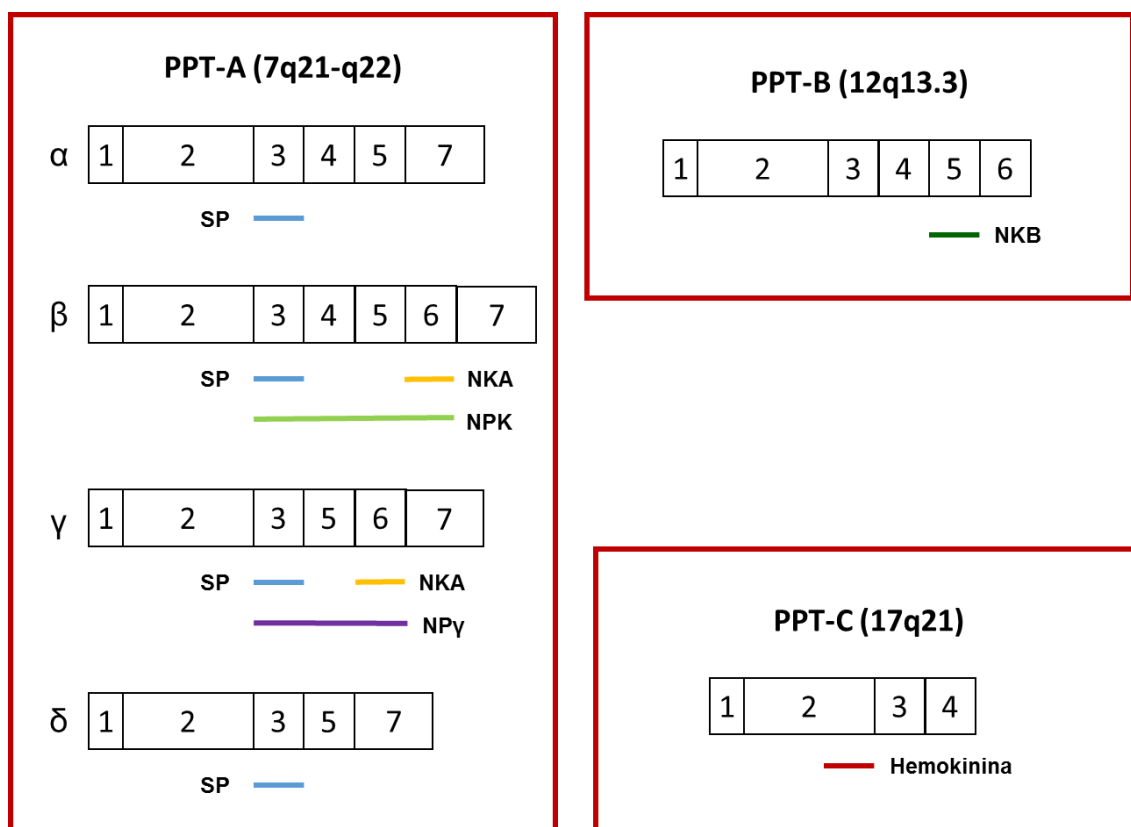


Ilustración 7. Genes de las preprotaciquininas, su localización cromosómica, mRNAs y péptidos codificados.

Cada uno de los mRNA de las PPT-A difiere del resto sólo en los exones que lo conforman y que codifican para una proteína concreta. La β PPT-A está constituida por los 7 exones que codifican para la PPT-A, y se diferencia de la α PPT-A y de la γ PPT-A porque en el mRNA les falta el sexto y el cuarto exón respectivamente.

Como se viene comentando la SP es muy abundante tanto a nivel del SNC como del SNP e incluso en los tejidos periféricos. Además es codificado por los tres mRNA, aunque la α PPT-A es más abundante en el SNC, concretamente en el cerebro mientras que la β PPT-A y PPT-A son más abundantes en los tejidos

periféricos. La PPT-B se originó a partir del mismo gen ancestral que la PPT-A pero aquella sólo codifica para NKB (179) (tabla 15).

Esta extensa distribución por distintos tipos de tejido y la amplitud de moléculas de mRNA codificantes hace pensar en que SP debe ser una molécula relevante en la vida de los seres vivos. Además se sabe que es una molécula altamente conservada a lo largo de la evolución, y que además puede ser sustituida por la Hemokinina-1.

Tabla 15. Resumen de datos sobre la biosíntesis de algunas de las taquicininas.

Péptido	mRNA	SNC/SNP	Cromosoma	Banda	Exon	Nº aa	aa alternativo
SP	α PPT-A	SNC	7	7q21-q22	3	11 aa	Phe
	β PPT-A	SNC/SNP	7	7q21-q22	3		
	γ PPT-A	SNC/SNP	7	7q21-q22	3		
	δ PPT-A	SNC/SNP	7	7q21-q22	3		
NKA	β PPT-A	SNC/SNP	7	7q21-q22	6	10 aa	Val
	γ PPT-A	SNC/SNP	7	7q21-q22	6		
NPK	β PPT-A	SNC/SNP	7	7q21-q22	3-6	37 aa	Val
NP γ	γ PPT-A	SNC/SNP	7	7q21-q22	3-6	21 aa	Val
NKB	PPT-B	SNC/SNP	12	12q13.3	5	10 aa	Val
Hemokinina A	PPT-C	SNC/SNP	17	17q21	2	11 aa	Phe

1.4.3 Localización y distribución de la SP

Los datos de la distribución y localización de la SP en el SNC y SNP han sido obtenidos mayoritariamente mediante técnicas de HPLC en combinación

con estudios radioinmunológicos e inmunohistoquímicos (229,230). En este aspecto es interesante destacar la inmunorreactividad cruzada de los anticuerpos anti SP con otras endoquininas similares a SP como la HK-1, endoquinina-A (EKA), endoquinina-B (EKB) e incluso la viroquinina (230).

La SP se ha encontrado en el SNC y SNP de todos los mamíferos con una distribución desigual y grandes concentraciones en algunas áreas mientras que otras se encuentran ausentes. Así, se encuentran grandes concentraciones de SP preferentemente a nivel subcortical en mesencéfalo, hipotálamo y área preóptica, mientras que en el cerebelo es casi indetectable. En la médula espinal humana se localiza mayoritariamente en las astas posteriores. En el sistema nervioso periférico se localiza principalmente en las neuronas sensoriales primarias de los ganglios yugular, nodoso y trigémino y en los nervios vago, ciático y esplénico.

En la mayoría de tejidos y órganos se encuentra ampliamente distribuida localizándose tanto alrededor de los vasos sanguíneos como en terminales nerviosas; presentándose en piel, glándulas sudoríparas, folículos pilosos, pulpa dentaria, aparato respiratorio, genitourinario, cardiovascular y en los plexos mientérico y submucoso del sistema digestivo (229).

En cuanto a la presencia de SP en placenta, Marzioni D. et al. (2005) demostraron por hibridación in situ la expresión en placentas humanas de RNAm específico para SP, así como la propia SP en tejidos fijados en parafina. Graf A.H. et al. (1996) también encontraron SP en las células de la decidua basal placentaria, usando técnicas inmunocitoquímicas. Sastry B.V. et al. (1981) también demostraron la presencia de SP en las vellosidades placentarias

mediante radioinmunoensayo, con unas concentraciones medias de 2,4 pg/g de tejido, mientras que Skrabanek P. et al. (1980) no detectaron SP en extractos de tejidos placentarios mediante técnicas inmunorreactivas. Muñoz et al. demostraron mediante técnicas inmunohistoquímicas la expresión de SP/NK-1R en los núcleos de las células del sincitiotrofoblasto y de las células de Hofbauer en la placenta (231,232).

1.4.4 Efectos fisiológicos de la SP

La SP es quizás el neurotransmisor más estudiado y al que más acciones farmacológicas se le han atribuido, tanto a nivel del SNC como del resto del organismo. Entre ellas destacan:

- Sistema Nervioso Central: existen numerosos estudios dedicados a aclarar el papel de la SP en el SNC, entre ellos se puede resumir: A nivel cortical, la SP actúa como modulador de la actividad neuronal (232,233). En la Sustancia Negra, la SP libera dopamina en interacción con otros neurotransmisores como, por ejemplo, el GABA. La presencia de SP y de su receptor NK1 en ciertas áreas como la amígdala sugiere su participación en la respuesta neuroquímica al estrés y en el comportamiento emocional (234,235). Asimismo, la SP está presente en neuronas de la médula espinal, siendo el mayor transmisor de la sensación dolorosa (235), demostrándose que la SP es la que realmente modula y regula la transmisión simpática de las neuronas nociceptivas de la médula espinal (234,235).

- Sistema visual: la SP participa como mediador en la respuesta ocular ante sustancias químicas irritantes, produciendo hiperemia y miosis que provoca de forma secundaria hipertensión ocular(237).
- Cadena ganglionar simpática: según algunos trabajos, la SP formaría parte del arco reflejo no colinérgico intestinal y proporcionaría una conexión funcional entre neuronas simpáticas y sensoriales, dotando a éstas de una funcionalidad, dejando de ser meras transductoras de información (238). Otros estudios, le proporcionan un papel regulador en la actividad simpática de los ganglios (239).
- Aparato digestivo: el papel de la SP en el tracto gastrointestinal ha sido bastante estudiado (239-241). Está implicada en las funciones de secreción de fluidos y electrolitos, motilidad intestinal, vascularización, función inmunitaria e incluso en la regulación intestinal.
- Sistema circulatorio: a nivel vascular, la SP tiene un potente efecto vasodilatador en humanos, debido a la acción directa en el músculo liso de la pared vascular, estando implicada en la denominada vasodilatación neurogénica; se trataría de neuronas extrínsecas de tipo sensorial las cuales rodean los vasos sanguíneos adyacentes (241).
- Aparato respiratorio: Nilsson G. et al. (1977) detectó inmunorreactividad de SP en el aparato respiratorio, en fibras nerviosas de SP en el músculo, tejido conectivo y epitelio de tráquea. Actualmente, se considera el más potente broncoconstrictor; causa vasodilatación; induce la secreción de moco y regula el mecanismo de aclaramiento mucociliar (242)

- Riñón y Sistema Urinario: la SP funciona como un potente natriurético y diurético, tanto a nivel central como localmente, favoreciendo el flujo sanguíneo renal (229)

1.4.5 Efectos fisiopatológicos de la SP

La SP muestra una amplia distribución en el SNC y periférico, pero también está presente en las células que no pertenecen al sistema nervioso (células del sistema inmunitario, hígado, pulmón, placenta, etc.). La SP se encuentra en casi todos los fluidos corporales como por ejemplo en la sangre, LCR, leche materna etc. Después de su unión a NK-1R regula muchas funciones fisiopatológicas por eso es probablemente el NT más estudiado y al que más acciones farmacológicas se le han atribuido a nivel del SNC y en el resto del organismo. Además, está implicada en la fisiopatología de distintas como son la migraña, la depresión, el sueño, trastornos centrales del movimiento, el traumatismo cráneo-encefálico y en enfermedades neurodegenerativas. Fuera del SNC está implicada en distintas enfermedades respiratorias (asma, hiperreactividad bronquial, tos no productiva, infecciones respiratorias, alergias y sarcoidosis), en enfermedades infecciosas (cistitis, infecciones virales, VIH, sepsis, meningitis, hepatitis, herpes zoster) así como en distintas entidades asociadas a procesos inflamatorios del tracto gastro-intestinal (diarrea y Enfermedad Inflamatoria Crónica Intestinal, EII).

1.4.5.1 SP y nocicepción.

Existen numerosos estudios sobre el papel de la SP en la transmisión del dolor. Se sabe que la SP es un modulador de la nocicepción, estando involucrado

en la regulación de la excitabilidad de las neuronas nociceptivas del asta dorsal de la médula además de estar involucrada en la integración al dolor, estrés y ansiedad (243). Parece que la SP tiene más que ver con el dolor crónico asociado a la inflamación que con el dolor agudo.

1.4.5.2 SP y depresión.

Según los trabajos de Kramer et al., la SP se involucra en desordenes psiquiátricos mediante la regulación de la afectividad emocional y la respuesta neuroquímica al estrés. Se sugiere, por tanto, que alteraciones en la SP o en el receptor NK-1R estarían involucradas en la depresión y/o en otros desordenes psiquiátricos. Trabajos posteriores (243) localizan la SP en el sistema límbico (hipotálamo y amígdala) del SNC, áreas relacionadas con el comportamiento emocional.

1.4.5.3 SP y cáncer.

En los años recientes, se ha demostrado que la sobre-expresión de la SP y su receptor NK-1R, están implicados en la proliferación tumoral (capacidad mitogénica (244). El receptor NK-1R se ha identificado en células tumorales de astrocitomas, glioblastomas, carcinoma medular de tiroides, cáncer de mama y ganglioneuroblastomas (245). También se ha detectado SP en algunos tumores cerebrales primarios (159). Se ha sugerido la existencia de un sistema autocrino en tumores cerebrales. Además, se ha demostrado in vitro (6) e in vivo (246) que a concentraciones fisiológicas de SP y de sustancia K se consigue inducir la mitogénesis a través de su receptor NK-1R en la línea celular de astrocitoma humano U373 MG.

Muñoz et al. han demostrado la presencia de NK-1R y la capacidad mitogénica de la SP en distintos tumores y líneas celulares procedentes de tumores humanos (neuroblastoma SKN-BE(2); glioma GAMG(247); retinoblastoma WERI-Rb-1 e Y-79 (248), cáncer de laringe HEP-2 (249) y adenocarcinoma gástrico y de colon (2)) tanto en el citoplasma como en el núcleo.

1.4.5.4 SP y sistema inmune.

Diferentes líneas de investigación indican que, la SP tiene un papel importante en la respuesta inmune, tanto en tejidos periféricos como en el SNC. El balance entre NP proinflamatorios y antiinflamatorios resulta crucial, de forma que la ruptura entre este delicado equilibrio jugaría un papel relevante en la patogénesis de enfermedades crónicas y autoinmunes. El binomio SP/NK-1R regula los sistemas inmune clásico celular (251,252) y humoral (251), pudiendo estimular la proliferación de células T (252), la diferenciación de células B, degranulación de los mastocitos, y estimular la diapedesis de los leucocitos (255-257). La regulación de la función de las células inmune por la SP podría originarse no sólo de fuentes neuronales (nervios sensoriales e inflamación neurogénica) sino también de elementos no neuronales como eosinófilos y macrófagos; además, la expresión tanto de la SP como de los receptores NK1 están aumentados durante la inflamación (254). En este sentido, en placentas afectadas por preeclampsia, existe una mayor expresión del gen TAC 1 debido principalmente a la invasión de células del sistema inmune (255).

Cada vez existen más evidencias que apoyan la existencia de una comunicación activa y bidireccional entre SNC y el SI. De esta manera, se acepta

que el SNC puede estimular o inhibir la actividad de la inmunidad tanto la innata como la adquirida. El complejo SP/NK-1R se considera el principal mediador en la interacción recíproca existente entre SI y SNC (ilustración 8).

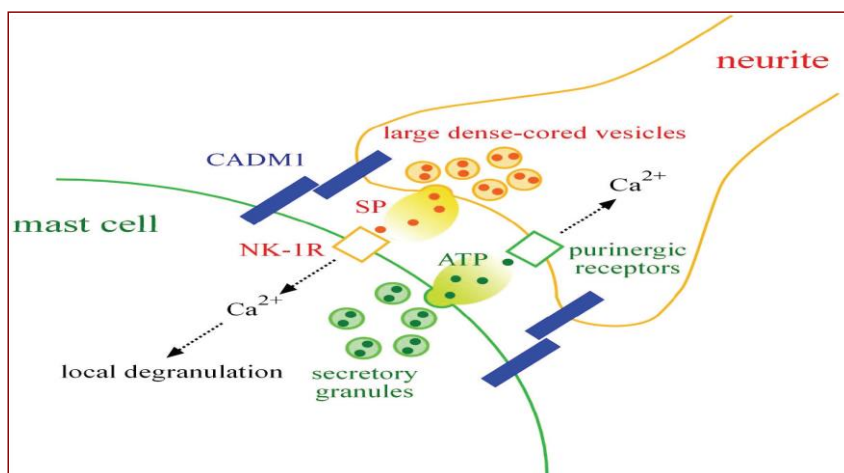


Ilustración 8. Representación esquemática del mecanismo molecular en la comunicación entre células nerviosas y mastocitos

1.4.5.5 SP e inflamación.

La SP está implicada en la inflamación neurogénica produciendo vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar, extravasación de plasma e infiltración granulocítica (260,261). La liberación de SP inducida por mediadores de la inflamación amplifica la respuesta inflamatoria(240,261). Además de su origen neurogénico, se ha demostrado que los macrófagos, eosinófilos, linfocitos y células dendríticas también producen SP (254)(262-264).

La SP aumenta la proliferación de los linfocitos y la producción de inmunoglobulinas, así como la secreción de citoquinas en linfocitos, monocitos, macrófagos y mastocitos (84,265,266).

De particular interés para nuestro estudio, es la inducción de la SP sobre la síntesis de citoquinas proinflamatorias en células de la neuroglia y linfoides como, aumento de expresión de las IL-2 en células T (259) y estimulación de la producción de IL-1 e IL-6 y TNF α en astrocitos, microglías (260) y macrófagos(252,269,270). La SP podría controlar estos mediadores inflamatorios a través del activador transcripcional NF-kB (factor nuclear unido a cadenas ligeras κ B), que a su vez regularía muchas citoquinas inflamatorias (262).

La revisión realizada por O'Connor et al. correlaciona elevados niveles de SP en sangre y aumento de expresión de los NK-1R en enfermedades inflamatorias como asma, enfermedad inflamatoria intestinal, sarcoidosis y artritis reumatoide.

1.4.5.6 SP y neoangiogénesis.

Un proceso característico de la inflamación es la neoangiogénesis; creación de nuevos vasos capilares y crecimiento de éstos a partir del sistema vascular preexistente con el consecuente incremento de flujo sanguíneo.

Existen varios estudios en los que se ha relacionado la SP con la neoangiogénesis tanto in vivo como in vitro. (263) describieron cómo la SP estimula la neovascularización in vivo, probablemente a través de la inducción de la proliferación de las células endoteliales. Por el contrario, la administración de antagonistas específicos de la SP bloquea esta respuesta en córnea de conejo. Fan et al. (1993) confirmaron la acción proangiogénica de la SP y mostraron también su inhibición por antagonistas del receptor NK-1R en rata. Walsh et al., en 1996, utilizando un modelo experimental en ratas, puso también

de manifiesto que la SP aumenta la angiogénesis por una acción directa mediada por los receptores NK-1R en la microvascularización, siendo un proceso esencial en la cura de heridas y en la inflamación.

Por otra parte, experimentos in vivo han mostrado que la SP endógena podría estar implicada en la neoangiogénesis relacionada con la inflamación neurogénica (264). Además, la neoangiogénesis se ha relacionado con el incremento de la expresión de receptores NK-1R (265)

La neoangiogénesis, es un elemento característico del desarrollo de tumores y se ha asociado con un aumento en la inervación del tejido y la expresión de los NK-1R. Se sabe que los análogos de los antagonistas de la SP, sinónimo de antagonistas de los receptores NK-1R, bloquean la acción proliferativa endotelial de la SP, y que ejercen actividad antitumoral.

1.4.5.7 SP y aparato digestivo

El papel de la SP en el TGI ha sido bastante estudiado (240) (266). Los tres tipos de RTK se expresan en las neuronas entéricas, músculo liso, células epiteliales, células del sistema inmune y vasos sanguíneos. Tanto la SP como otras TK están implicadas en las funciones de secreción de fluidos y electrolitos, motilidad intestinal, vascularización, función inmunitaria e incluso se habla de la regulación taquicinérgica intestinal y del potencial papel de los RTK como dianas terapéuticas.

El complejo SP/NK-1R representa un importante circuito inmunorregulador implicado en varias respuestas intestinales fisiológicas y fisiopatológicas y en estados de enfermedad. El SNE es la estructura nerviosa

más complicada fuera del SNC, y es la única parte del sistema nervioso periférico intrínsecamente capaz de mediar actividad refleja (221). La SP se expresa en los plexos mientérico y submucoso, en las raíces de los ganglios dorsales y en neuronas intrínsecas y extrínsecas (266)

Después del SNC el intestino es la localización con una concentración más alta de SP y frecuentemente se utiliza como modelo para mostrar las propiedades inmunomoduladores de la misma (267).

La SP es fundamental para mantener la contractilidad intestinal y tanto ella como el NK-1R parecen estar implicados en la transmisión muscular intestinal (275,276). También se ha demostrado el papel de la SP en la diarrea y la inflamación inducida por la toxina A Clostridium difficile (277,278) y en la patofisiología de otros modelos animales como la infección por Salmonella (279,280) e infecciones por parásitos intestinales(196,281).

También la SP, a través del NK-1R, posee efectos anti-apoptóticos en la mucosa del colon mediante la activación de Akt o proteína-quinasa B (molécula antiapoptoica), lo que impide la apoptosis y media de recuperación de tejido durante la colitis (271).

En una reciente revisión se muestra la importancia de la SP y el NK-1R en la modulación de las cascadas de la inflamación de la mucosa durante la terapia citotóxica en pacientes oncológicos (272).

También en la señalización sensorial y nocicepción secundaria a la distensión intestinal se ha visto implicada la liberación central de la SP. Por otro lado, estudios en ratones han demostrado que el NK-1R regula la actividad fibrinolítica peritoneal y la formación de adherencias postoperatorias.

Por último, también se sabe que la SP ejerce un efecto trófico durante el período embrionario. Así, De Felipe, Pinnock & Hunt evidenciaron la implicación de la SP y el NK-1R en el desarrollo de la médula espinal durante la embriogénesis (273). Kovska y colaboradores demuestran un incremento sustancial en la liberación de SP, péptido intestinal vasoactivo (VIP) y ONS durante el proceso de maduración postnatal del SI de la mucosa intestinal en crías de cerdos actuando dichos NP como inmunomoduladores endógenos (274).

El mecanismo de participación del complejo SP/NK-1R en la inflamación intestinal implica la sobrerregulación y la activación de NF- κ B en las células diana, estimulando las vías inflamatorias a través de la producción de las citoquinas proinflamatorias en el TGI incluyendo la IL-1, IL-6, IL-8, y el TNF- α (275) . La activación de NF- κ B inducida por la SP puede ser independiente o dependiente de la activación de las proteín-quinasa activadas por mitógenos (MAPK)

Evidencias recientes indican también que la SP induce en los colonocitos humanos la fosforilación de la protein kinasa C (PKC) δ implicada funcionalmente en la activación de NF- κ B (276). Además, la SP estimula la expresión de la COX-2 y la PGE-2 en células epiteliales de colon humano (276). A la inversa, las citoquinas proinflamatorias regulan la expresión de los NK-1R (277)

En la EII (enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU)) además de la evidencia indirecta de estudios en humanos, los resultados de los modelos animales sugieren con fuerza el papel funcional de la SP y sus receptores en la

fisiopatología de la misma (289,290) así como la eficacia de los antagonistas del NK-1R como opción terapéutica (279).

Los principales efectos inducidos por la SP en la señalización neuroinmune sobre la inflamación y reparación intestinal en la EII. La SP se libera en diversas áreas del intestino, incluyendo, los plexos mientérico y submucoso. Una vez liberada la SP se une al NK-1R en las células epiteliales del colon que activan tanto las vías proinflamatorias como las de reparación y proliferación tisular. La SP puede activar la PKC δ , causando la activación del sistema de NF- κ B con el consiguiente aumento de la síntesis de citoquinas proinflamatorias por las células epiteliales y la lámina propia, tales como IL-8 que atraen neutrófilos y causan infiltración. Al mismo tiempo, SP también puede activar vías importantes en la reparación tisular mediante la unión a NK-1R, induciendo metaloproteinasas de la matriz (MMP) que causan la liberación de TGF α , que posteriormente se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico activando la vía que lleva a la proliferación celular y la reparación de los tejidos. En la EII existe una sobre-regulación de NK-1R, así como de citoquinas proinflamatorias. Muchas células inflamatorias también se ven afectados en la EII.

1.4.6 Receptores taquicinérgicos.

Los receptores de las taquicinas interactúan con receptores específicos de membrana. Tres RTK distintos NK-1R, NK-2R y NK-3R, se han clonado en diferentes especies incluyendo el ser humano (280). Pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G, que realizan sus acciones a través de la activación de una o más proteínas G (*guanina nucleotide-binding regulatory*

proteins). Por su estructura típica, también se les llama receptores de los siete dominios transmembrana hidrofóbicos.

La unión de un agonista a su receptor específico en la superficie celular causa un cambio conformacional en el receptor que permite la interacción con la proteína G; se forma así un complejo de alta afinidad: agonista-receptor-proteína G.

La forma activada de la proteína G se disocia del receptor y activa la proteína efectora, modulando los niveles de segundos mensajeros intracelulares (ilustración 9).

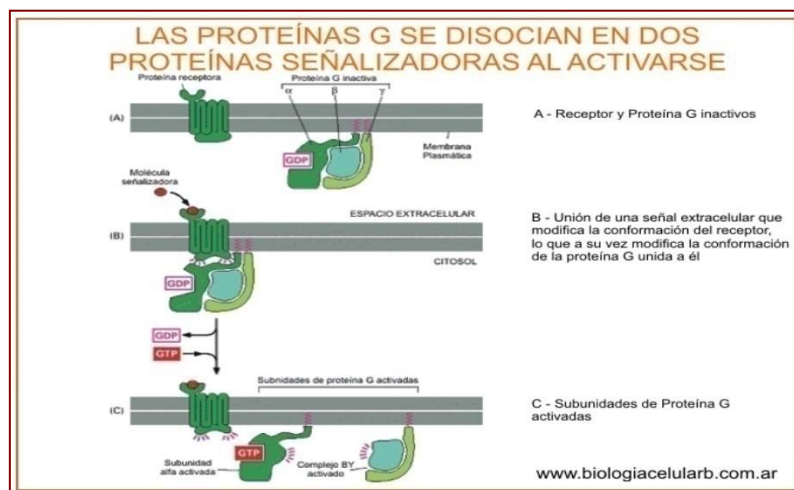


Ilustración 9. Esquema del modo de acción de los receptores acoplados a proteína G.

Las proteínas G activadas median la estimulación o inhibición de enzimas efectoras y canales iónicos, incluyendo: adenil ciclasa, guaninil ciclasa, fosfolipasa C y A2, y canales de calcio y potasio. (281)

La interacción del AMPc con la subunidad reguladora provoca la liberación de la unidad catalítica, que actúa sobre el DNA y produce efectos a largo plazo sobre el metabolismo, crecimiento y diferenciación celular.

Diversos estudios farmacológicos, han propuesto la existencia de, al menos, tres tipos diferentes de receptores de TK en mamíferos (282)

El primer receptor de NP (receptor de la Sustancia K) fue clonado por Nakanishi et al. en 1987. Este receptor es afín a la SP. Varios años más tarde se clonaron otros receptores de las taquicininas (283)

Por medio de clonación molecular y métodos electrofisiológicos, se han identificado los tres receptores de TK en mamíferos como un subgrupo de la superfamilia de receptores heptahelicales asociados a proteína G, con un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo citoplásmico (257)

Se ha determinado la existencia de los receptores NK-1R, NK-2R, y NK-3R. Recientemente, se ha clonado una variante del NK3, que se ha denominado NK4 y se han identificado los genes que codifican NK-1R, NK-2R y NK-3R (284).





De manera general, las TK se unen a sus receptores específicamente, aunque existe afinidad hacia los otros subtipos de receptores por el reconocimiento del núcleo carboxi terminal de los diferentes NP (285). En las tablas 17 y 18 se resume la afinidad de las TK hacia los distintos receptores NK-1R, NK-2R, y NK-3R.

Tabla 16. Afinidad de las TK a los diferentes receptores NK.

RECEPTOR	TAQUICININA
NK-1R	SP>NKA>NKB
NK-2R	NKA>NKB>SP
NK-3R	NKB>NKA>SP

El receptor NK-1R es el mejor caracterizado hasta ahora. Es una glicoproteína de 407 residuos y una masa de 46 kDa cuyo ligando específico es la SP. Se ha postulado que la alta conservación interespecie de la estructura NK-1R es debida a la necesidad de interactuar con más de un ligando de alta afinidad. Es miembro de la familia de los receptores acoplados a proteína G, y más en concretamente con las subunidades alfa de la proteína de G9 y G11 (286)

Tabla 17. Tipos, estructura y especificidad de los receptores de TK

Receptor	Esquema del receptor	Takicininas específicas
NK-1R		
Clásico		SP
Sensible a séptidos		SP, NKA, NPK, NPY, NKB
Nuevo NK-1R-sensible		SP, NKA, NPK, NPY
NK-2R		NKA, NPK, NPY
NK-3R		NKB

En la tabla 16. Se esquematizan la estructura y disposición transmembrana de los receptores NK-1R, NK-2R y NK-3R, que constan de 407, 398 y 452 residuos de aminoácido, respectivamente; siete dominios transmembrana, con un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo terminal intracelular. Además, se muestran las TK afines a cada receptor.

Gracias al desarrollo de los antagonistas tanto peptídicos como no peptídicos, se conoce más sobre el sitio unión de la SP al receptor NK1. De esta manera, se sabe que los giros extracelulares del segundo y tercer dominio transmembrana están involucrados en esta unión, debido al carácter hidrofílico de la SP.

La SP no sólo activa los receptores NK-1R, sino también los NK-2R y NK-3R en diversos tejidos y dependiendo de diversas condiciones, como por ejemplo: una alta disponibilidad del receptor, o si existen elevadas concentraciones del NP (257). Los antagonistas no peptídicos hidrófobos se unen más profundamente entre los segmentos transmembrana (287).

El gen que codifica el receptor NK1 se ha denominado *Tachykinin Receptor 1* (TACR1). Mediante RT-PCR, se ha establecido la presencia del gen TACR1 en diferentes tejidos humanos, encontrándose en todos los tejidos evaluados por el estudio. Ya anteriormente se conocía la distribución del receptor NK-1R; así la mayor expresión en el SNC se encuentra a nivel del locus coeruleus, estriado ventral, hipocampo y núcleos amigdalares, y en menor proporción en el cortex cerebral, aunque su distribución es muy amplia en todo el organismo humano, como en las células intersticiales arteriales de Cajal de los vasos arteriales (288), en las células de los islotes pancreáticos de ratones

(289), en las células del sistema inmune (290), en el tracto gastrointestinal (291), en el pulmón (242), en los fibroblastos (263), y en tejido uterino tanto de mujeres embarazadas como no embarazadas (292).

También se conocen diferentes isoformas del receptor NK-1R; difieren unos de otro en la composición de aminoácidos y en su peso molecular, aunque aún no se han establecido bien las posibles diferencias funcionales. Hasta día de hoy, se han descrito siete isoformas, la mayoría de ellas en la línea celular linfoblástica humana IM-9 en las que se presentan las isoformas de 16, 33, 58, 78 y 116 kDa (293), mientras que en los linfocitos normales humanos se presenta mayoritariamente la de 58 kDa (294). Caberlotto L. et al. (2003) determinaron diferentes isoformas en cerebro humano; van Ginkel F.W. y Pascual D.W. (1996) y Nakata Y. et al. (1988) observaron isoformas de iguales pesos moleculares en cerebros de ratas. También se ha descrito la existencia de NK-1R en tejido pancreático tanto tumoral como normal de un peso molecular de 46 kDa (295).

En los últimos años, Muñoz M. et al. han demostrado la presencia de isoformas de los receptores NK1 en líneas celulares tumorales humanas, siendo de 54 kDa para la línea celular de neuroblastoma SKN-BE (2); de 37 y 33-34 kDa. en la línea celular de glioma GAMG (296); de 33, 58 y 75 kDa en las líneas de retinoblastoma WERI-Rb-1 e Y-79 y de adenocarcinoma de colon SW-403 (297) de 34, 46, 58 y 75 kDa en la línea de cáncer de laringe HEP-2 (298) y en la línea de adenocarcinoma gástrico 23132/37 (299).

Existen además dos variantes naturales del NK-1R, una de 407 aa de longitud, conocida como forma completa o *full-length* (NK-1RF) que es el objeto del presente estudio y la isoforma de 311 aa denominada troncada (NK-1RT).

Ambas isoformas median las acciones de SP. El truncamiento del receptor altera parcialmente los motivos de señalización de la cola del extremo carboxilo, un sitio crítico para mediar la señalización de NK-1R. Por ello NK-1RT es un receptor "menos eficiente". Aunque NK-1RF es la isoforma predominante en el SNC y SNP, NK-1RT se expresa en varios tejidos y células, que incluyen monocitos, células NK y células T. El dominio de unión SP no se ve afectado por el truncamiento y este sitio es idéntico en ambas isoformas del receptor NK-1R. Sin embargo, mientras que las células que expresan NK-1RF responden a concentraciones nanomolares de SP, la activación de monocitos y macrófagos, mediada por NK-1RT, requiere concentraciones micromolares de SP para provocar respuestas de señalización. Los niveles elevados de SP en plasma se asocian con un aumento de las respuestas inflamatorias (300).

1.4.7 El receptor NK-1R

La acción biológica de las taquicininas se realiza a través de sus receptores. En el caso de la SP su acción se realiza cuando este undecapéptido se une a cualquiera de sus receptores de membrana conocidos como receptores de NK (NK-R). Los NK-R pertenecen a la familia de los receptores de membrana *rhodopsin-like* que constan de 7 dominios hidrofóbicos transmembrana unidos por bucles intra y extracelulares y que están acoplados a proteína G (180-182) (ilustración 10).

Aunque la SP es el ligando más afín al NK-1R (afinidad 0.05-0.5nM) (127), todas las taquicininas tienen en común la secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo (responsable de la actividad biológica) y por tanto existe un cierto grado de reactividad cruzada entre las taquicininas y sus receptores (183). Se ha

descrito que el receptor NK-1R presenta un alto grado de similitud entre especies, como se ha demostrado en humanos, ratón, rata y cobaya (180).

El receptor NK-1R presenta una región no traducida relativamente larga en el extremo 5' que constituye un punto de unión a proteínas de respuesta a AMP cíclico (CREB)/calcio elemental. Éstos responden a niveles de cAMP o de calcio elemental, lo que estimula la transcripción. Esta secuencia juega un papel importante en las situaciones en las que se produce un estímulo intenso o mantenido del receptor NK-1R. El 30% de la secuencia de este extremo está

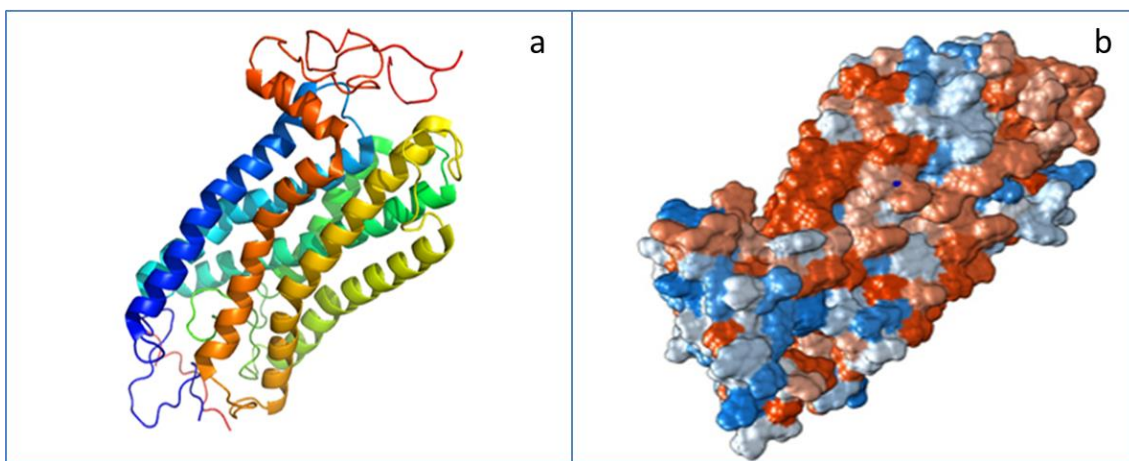


Ilustración 10. Modelos tridimensionales del receptor NK-1R. PDB REF: 2KS9.

constituido por serina y treonina que constituyen un punto potencial de fosforilación de la proteína G acoplada a receptor. La estimulación del receptor NK-1R activa la fosfolipasa C β (PLC β) que desencadena un aumento intracelular transitorio de inositol 1,4,5-trifosfato (IP $_3$) y un incremento de las concentraciones de calcio intracelular. También desencadena la activación de la fosfolipasa A $_2$ (PLA $_2$) que induce a su vez una movilización del ácido araquidónico y de la adenilciclase que induce una acumulación de cAMP (184). No parece existir una relación cruzada entre la acumulación de cAMP y la síntesis de IP $_3$ (185).

En el SNC, la expresión del NK-1R es muy alta a nivel del núcleo caudado-putamen y del colículo superior (tubérculo cuadrigémino superior); y de moderada a baja en el colículo inferior (tubérculo cuadrigémino inferior), bulbo olfatorio, hipotálamo, hipocampo, sustancia negra, corteza cerebral, septo, núcleo estriado, mesencéfalo y cuerno dorsal de la médula espinal (186, 187).

En estudios con microscopía confocal mediante técnicas de inmunofluorescencia, se ha puesto de manifiesto que la SP induce la internalización del NK-1R en neuronas de la médula espinal. Esta internalización no se produce cuando se expone el receptor NK-1R a alguno de sus antagonistas (188).

Durante años se ha aceptado la hipótesis de que NK-1R funciona como un autorreceptor, es decir, que la SP regula su propia liberación (159, 189). La actividad moduladora de la SP a nivel presináptico se ha demostrado en la médula espinal del gato y en los ganglios simpático y ciliar (lenticular) del pollo; en los que la SP puede producir efectos excitatorios o inhibitorios. Estudios *in vitro* han demostrado que la SP es liberada por el cuerpo de la neurona aferente produciendo una excitación cruzada entre las neuronas adyacentes. Algunos antagonistas específicos del NK-1R (RP67580 y SR140333) inducen un incremento en la liberación de SP en la médula espinal tras un estímulo eléctrico de las fibras C (190), esto apoya la hipótesis de que la SP puede ejercer un *feedback* negativo sobre su propia liberación mediante la estimulación de los autorreceptores inhibidores de NK-1R, o mediante el bloqueo de los canales de potasio que afecta al proceso de despolarización de la membrana.

El papel como autorreceptor de los receptores de SP tiene una importante relevancia en la fisiopatología de la inflamación tras un daño nervioso o estímulo nocivo. Por ejemplo el dolor neuropático que se caracteriza por alodinia e hiperalgesia persistentes pueden generar, per se, potenciales de acción ectópicos, capaces de mantener el estímulo nociceptivo (191).

1.4.8 La SP/NK-1R y su relación con la patología en general: dolor, inflamación, cáncer

El papel de las células inflamatorias en la inflamación neurogénica es complejo, entre otras causas por la variabilidad en la expresión de los receptores celulares durante las diferentes fases de la evolución desde el punto de origen hasta el lugar de localización de la inflamación.

La SP ejerce una actividad quimiotáctica sobre neutrófilos y eosinófilos in vitro, actúa sobre el factor activador de la lisis plaquetaria (actividad acetil-CoA transferasa), induce citotoxicidad dependiente de anticuerpos o mediada por células, y estimula y mantiene los efectos provocados por otros agentes. No se conoce muy bien cuál es el papel de los NK-1R en las células inflamatorias pero se ha demostrado que los efectos estimulantes de la SP sobre los procesos inflamatorios pueden bloquearse mediante la administración de antagonistas selectivos de dichos receptores (192, 193). Numerosos estudios en ratas, han demostrado que la SP induce la liberación de histamina por parte de los mastocitos peritoneales y que esta respuesta se bloquea cuando se administra CP96345 (194). También se ha descrito la aparición de broncoconstricción dependiente de mastocitos inducidos por SP (163, 195-197).

Cabe destacar que la SP juega un papel importante en la migración extravascular de las células inflamatorias hacia los tejidos inflamados, aunque el mecanismo aún no está del todo claro.

La SP realiza un papel relevante tanto a nivel del SNC como del SNP y parece estar implicado en la comunicación entre el sistema nervioso y el sistema inmunitario en varios procesos incluidos la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). La SP ejerce sobre el sistema inmune un efecto inmunomodulador, que puede ser tanto de tipo proinflamatorio como antiinflamatorio, incluyendo la regulación positiva de numerosas citoquinas y receptores celulares (198). Aunque en general, la interacción entre la SP y el sistema inmune suele resultar en un respuesta proinflamatoria (199-201).

Se conoce que los niveles plasmáticos de SP en los individuos infectados con VIH están aumentados (202, 203), que el tratamiento con SP de los monocitos derivados de macrófagos promueve la infección por el VIH, y que el tratamiento con antagonistas de NK-1R inhibe la infección por este virus (204-206). En ensayos clínicos en humanos, el tratamiento durante 2 semanas con antagonistas del NK-1R (aprepitant) da lugar a una disminución de varios marcadores proinflamatorios como: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la proteína inflamatoria de macrófagos 1- α (MIP-1 α), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), las interleuquinas 6 y 8 (IL-6, IL-8, respectivamente) y del receptor de complejos de hemoglobina-haptoglobina de los macrófagos (CD163); en comparación con los grupos tratados con placebo (207).

La sepsis es un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica intensa (SIRS) generalmente causada por una infección bacteriana (208, 209). Se ha demostrado que la SP es un neuropéptido inmunorregulador implicado en diversas enfermedades inflamatorias, incluida la sepsis. Previamente se había demostrado que los ratones *knock-out* para el gen de la PPT-A estaban protegidos contra sepsis polimicrobiana de manera significativa (210); y que el tratamiento con antagonistas del NK-1R fue beneficioso contra la lesión pulmonar en un modelo de sepsis en ratón (211). El mecanismo por el cual el bloqueo de NK-1R protege contra la lesión pulmonar aún no se ha dilucidado.

Los datos disponibles permiten hipotetizar que la SP a través de NK-1R inicia una cascada de señalización mediada por proteína-quinasa alfa (PK α) que conduce a la activación del factor nuclear de cadenas kappa ligeras-potenciador de las células B activadas (NF- κ B) y de la proteína activadora 1 (AP-1); y modula adicionalmente los mediadores proinflamatorios en la sepsis polimicrobiana. Este efecto de la SP es bloqueado 8 horas después de la administración del antagonista de NK-1R, SR140333 (212). De acuerdo con estos resultados, Hedge et al. demostraron en un estudio *in vivo* que el tratamiento de ratones sépticos con el citado antagonista de NK-1R redujo la degradación de I κ B y la actividad nuclear de NF- κ B (212). Además, el tratamiento con SR140333 en la sepsis redujo la actividad de otro factor de transcripción, AP-1, que regula varios genes de citoquinas y quimioquinas (213). Por lo tanto, SR140333 parece modular los mediadores inflamatorios regulando la activación de NF- κ B y AP-1 (212).

La SP está implicada en la proliferación y migración de diferentes tipos celulares y en diferentes organismos, siendo un efecto muy conservado a lo largo de la evolución. En este sentido, también está implicada en la proliferación y migración de las células tumorales y el uso de antagonistas de la SP están siendo investigados por su potencial terapéutico en el cáncer ya que disminuyen el crecimiento y el desarrollo de metástasis en diferentes líneas celulares de cáncer (6, 214-221).

SP regula la proliferación de células cancerosas, ejerce un efecto antiapoptótico, estimula la migración de células tumorales favoreciendo la invasión y metástasis, y estimula la neoangiogénesis (3) (ilustraciones 11 y 12).

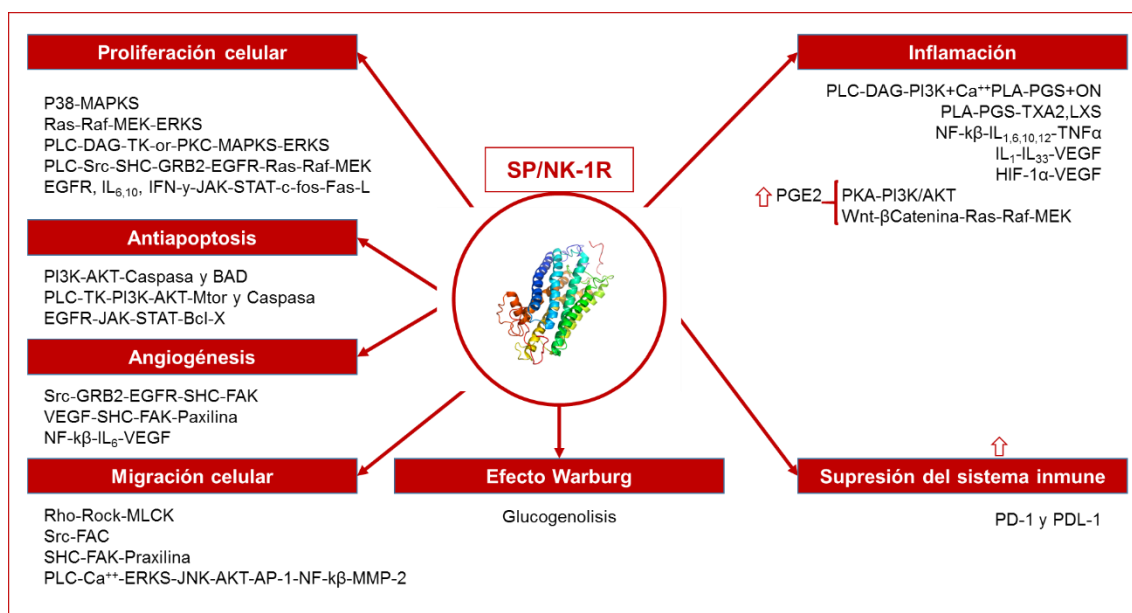


Ilustración 11. Papel y vías de señalización de la SP/NK-1R a nivel nuclear tanto en la inflamación como en la progresión, angiogénesis y migración tumoral.

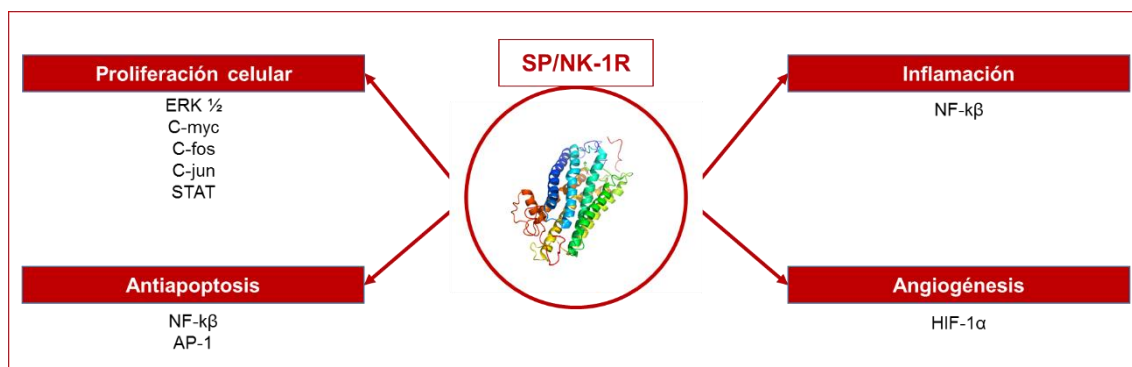


Ilustración 12. Papel y vías de señalización de la SP/NK-1R a nivel citoplásmico tanto en la inflamación como en la progresión, angiogénesis y migración tumoral.

La neovascularización, o neoangiogénesis, es un proceso secuencial, que se inicia con la proliferación endotelial temprana, a continuación se produce la formación de nuevos vasos sanguíneos, seguido por un aumento del flujo sanguíneo, para finalmente, producirse la maduración de los sistemas reguladores neurovasculares endógenos en los tejidos inflamados (174,301). El crecimiento de nuevos vasos a partir de un árbol vascular preexistente es una característica común de la inflamación crónica (la neoangiogénesis temprana es un paso clave en la transición de la inflamación aguda a la persistente) y la cicatrización de heridas (174). La neoangiogénesis es un fenómeno característico de los tumores cuyo desarrollo, se ha asociado con un aumento de la invasión de los tejidos y la expresión de los receptores NK-1R. Se ha demostrado la presencia de SP/NK-1R en la mayoría de los vasos sanguíneos intra y peritumorales en la mayoría de los cánceres estudiados en la gran mayoría de los tumores, los receptores SP y NK-1 (174,245) (ilustración 13).

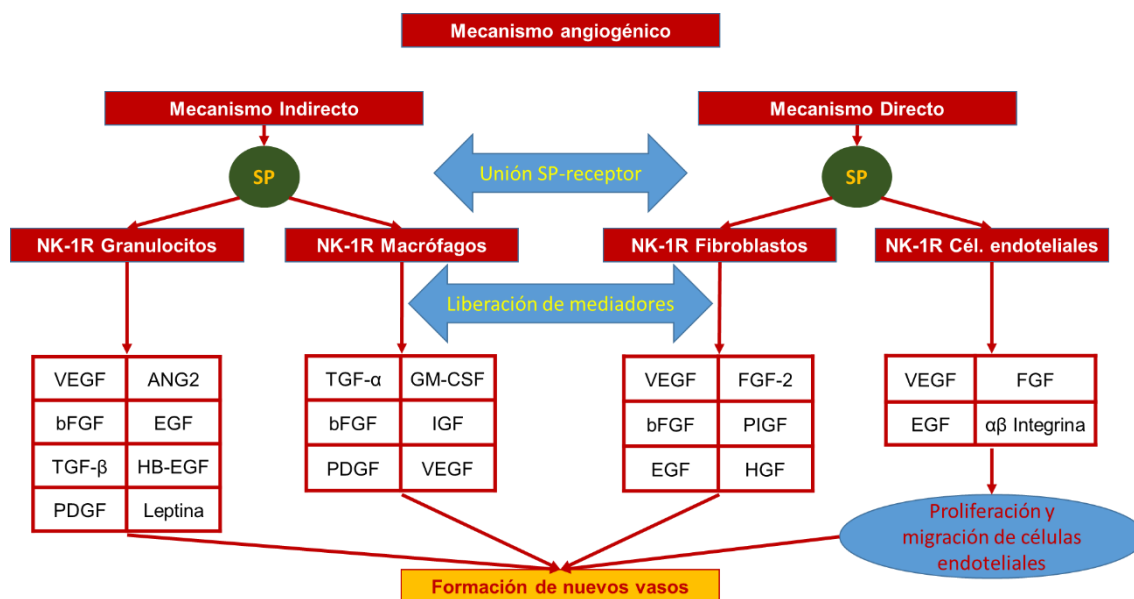


Ilustración 13. Mecanismos de angiogénesis a través de SP/NK-1R.

Como se ha comentado arriba SP es un importante mediador de la inflamación neurogénica. La liberación de este NP por los terminales nerviosos periféricos induce el crecimiento de los vasos capilares in vivo y en la proliferación de células endoteliales cultivadas in vitro (301).

La proliferación de células endoteliales aumenta de forma dependiente a la concentración de los agonistas del receptor NK-1R. Se ha demostrado que los agonistas selectivos de NK-2R y NK-3R no tienen efectos significativos sobre la proliferación de células endoteliales (301). Estos hallazgos indican que tanto SP como los agonistas NK-1R pueden estimular directamente el proceso de neovascularización, probablemente mediante la inducción de la proliferación de células endoteliales (263). La angiogénesis mediada por SP es el resultado de la acción directa de los NK-1R que están presentes en alta densidad en la membrana plasmática de las células de la pared de los vasos sanguíneos en los

vasos sanguíneos. Por lo tanto, la SP puede influir decisivamente en la estructura vascular, tanto fuera como dentro del tumor, el flujo sanguíneo y por tanto el aporte de los factores necesarios para que el tumor y su estroma se desarrollen (174,245).

Se ha demostrado con xenoinjerto de carcinoma pancreático en un modelo de ratón desnudo que los antagonistas de NK-1R ejercen acciones antitumorales (302), mientras que si se administra SP la angiogénesis puede incrementarse. En un experimento realizado por Berger et al. con un xenoinjerto de hepatoblastoma en un modelo de ratón desnudo se demostró que el antagonista NK-1R, aprepitant, inhibía la angiogénesis (303).

A continuación se presenta una tabla resumen con los efectos de SP sobre su receptor específico NK-1R (tabla 19).

Tabla 18. Células que expresan NK-1R y efectos desencadenados por la unión de SP a este receptor.

Céls. diana que expresan NK-1R en membrana plasmática	Efectos en SNC/SNP	Efectos vasculares	Efectos inflamatorios	Efectos en neoplasias
Neuronas del SNC/SNP	Depresión	Regulación del flujo vascular Vasodilatación	Estimulación del sistema inmune Quimiotaxis	Estimula la proliferación celular Inhibe la apoptosis
Mastocitos	Dolor			
Macrófagos	Inflamación neurogénica	Extravasación plasmática	Estimula la actividad de macrófagos	Promueve la migración celular
Céls. mesenquimales	Sialogogo	Aumento de permeabilidad	Aumenta la formación de colágeno	Aumento de síntesis de mRNA de NK-1R
Céls. endoteliales	Control del movimiento		Estimula liberación de citoquinas	
Fibroblastos	Percepción sensorial		Estimula liberación de quimoquinas	
Céls. tumorales	Supervivencia y degeneración neuronal			
Células B y T de LLA	Motilidad gástrica			
Ca. de mama	Micción			
Ca. colorrectal	Regulación del Sistema Cardiovascular			

Céls. diana que expresan NK-1R en membrana plasmática	Efectos en SNC/SNP	Efectos vasculares	Efectos inflamatorios	Efectos en neoplasias
Ca. gástrico	Control de los mecanismos respiratorios			
Glioma/Astrocitoma				
Hepatoblastoma				
Ca. de laringe				
Ca. de pulmón (céls. pequeñas/no pequeñas)				
Melanoma				
Neuroblastoma				
Ca. de cavidad oral				
Osteosarcoma				
Ca. de páncreas				
Retinoblastoma				
Ca. de tiroides				

Céls.: células; Ca.: cáncer/carcinoma; SNC: sistema nervioso central; SNP: sistema nervioso periférico;

Los mecanismos moleculares de acción de SP/NK-1R se resumen en la ilustración 15.

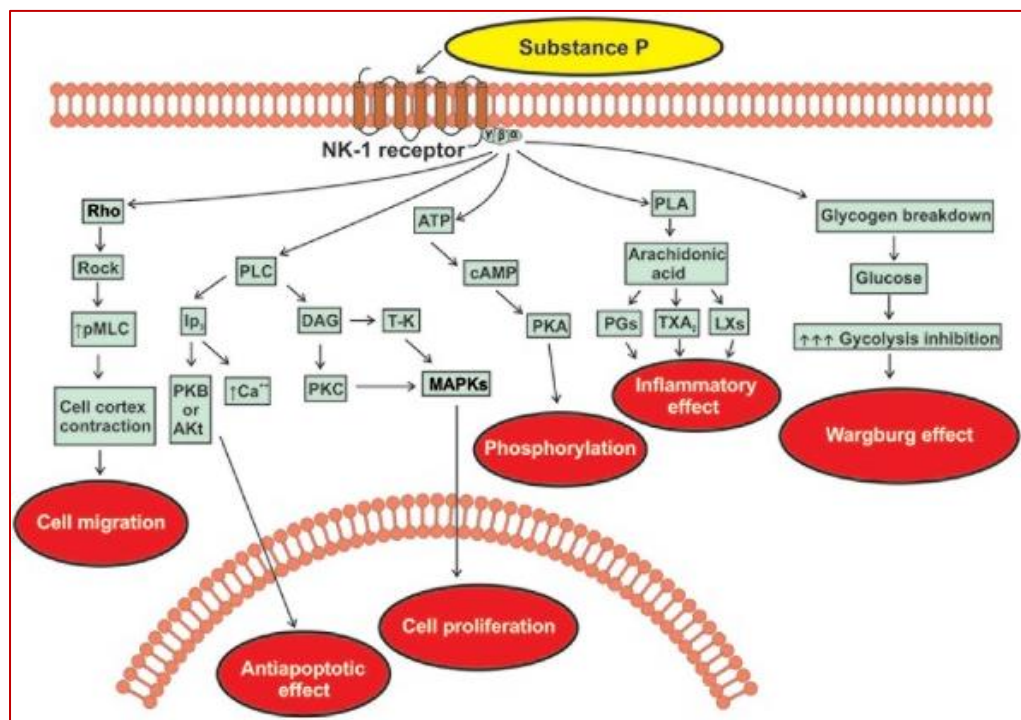


Ilustración 15. Mecanismos moleculares de acción de SP/NK-1R. Tomado de Muñoz et al. *J. Biosci.* 40(2), June 2015, 441–463.

1.4.8.1 Beneficios de la SP/NK-1R como diana terapéutica en la inflamación y el cáncer

La terapia antineoplásica ha logrado mejorar las expectativas de vida de los pacientes con cáncer en general; pero no todos los tumores han respondido de igual manera a esos tratamientos. Desde hace dos décadas vienen ensayándose fármacos dirigidos a dianas moleculares concretas con el fin de diseñar estrategias terapéuticas personalizadas. Según Muñoz et al., es necesario crear fármacos antineoplásicos dirigidos a destruir específicamente el tumor produciendo el menor número de eventos adversos en el huésped, es decir, hay que diseñar fármacos antitumorales parasitotrópicos y no organotrópicos (174); idea que ya fue enunciada y bautizada por Paul Erlich

como “balas mágicas” alrededor de 1900 con los fármacos antihelmínticos (174). Según estos mismos autores la terapia anticáncer actual dista mucho de tener el perfil de las “balas mágicas” debido a su citotoxicidad y a los severos eventos adversos que provocan (174).

La SP, a través de su receptor específico NK-1R actúa como mitógeno en distintas líneas celulares procedentes de tumores humanos. Además SP/NK-1R desempeña un papel relevante en la progresión y migración de distintos cánceres humanos. Además, se ha demostrado que el uso de antagonistas de NK-1R induce la apoptosis en las células tumorales. Por todo ello, el binomio SP/NK-1R puede ser una diana diagnóstica y terapéutica de interés (8,15–25).

La SP, liberada por los terminales periféricos de primera neurona sensitiva, se ha asociado a la inflamación neurogénica, de hecho muchos de estos terminales se localizan junto a los vasos sanguíneos. La acción de la SP liberada en los tejidos periféricos se parece a los cambios inducidos por la inflamación aguda: vasodilatación (SP es un potente vasodilatador), permeabilidad vascular (SP aumenta la permeabilidad), degranulación de los mastocitos y modulación de la respuesta inmune celular. Además se ha visto que una sobreexpresión de su receptor NK-1R se asocia a un aumento del dolor crónico (257) y su bloqueo mediante antagonistas (L-733,060) tiene un efecto analgésico y antiinflamatorio (311,312).

Tanto los antagonistas peptídicos como no peptídicos del receptor NK-1, una vez unidos a éste, producen una acción antiproliferativa como han demostrado Muñoz et al. en distintos tumores y recientemente en las células del

carcinoma de pulmón tanto de células pequeñas (CPCP)) como no de células pequeñas (CPNCP) (221-223).

1.4.9 Antagonistas NK-1R.

El desarrollo de los antagonistas de la SP, ha permitido comprender mejor su fisiología, así como la fisiopatología del receptor NK-1R. Se han desarrollado pequeñas moléculas antagonistas NK-1R tanto peptídicas como no peptídicas y más o menos selectivas permitiendo nuevos avances en el uso terapéutico de estos agentes (313). Hasta el desarrollo del primer antagonista no peptídico (314), surgieron muchos antagonistas de naturaleza peptídica; sin embargo, su baja eficacia, hizo que las investigaciones se dirigieran más hacia las moléculas de naturaleza no peptídica, las cuales son muchas y con un amplio rango de usos terapéuticos (312,314).

Podemos hablar de más de 300 compuestos de diferente naturaleza (313). Estos antagonistas producen analgesia (315), tienen efectos antidepresivos (316), ansiolíticos (317), antieméticos (318) y antitumorales (245,311,318) demuestran que el L-733,060, puede ser un buen antiinflamatorio y protector hepático, ya que reduce la inflamación, edema, infiltración neutrófilica, apoptosis y necrosis del hepatocito en un modelo de inflamación hepática en ratón.

Hasta el desarrollo del primer antagonista no peptídico, surgieron muchos antagonistas de naturaleza peptídica, sin embargo, su baja eficacia, hizo que sus investigaciones se dirigieran hacia análogos no peptídicos más potentes y más selectivos que son muchos y con un amplio rango de usos terapéuticos. Aunque hay más de 300 antagonistas de los NK-1R actualmente el Aprepitant, su sal, el

Fosaprepitant, y Rolapitant son los antagonistas de los NK-1R disponibles para uso clínico (180). Estos antagonistas están indicados para el tratamiento de las náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia.

Los sitios de la unión para los antagonistas no peptídicos de los NK-1R, SP y antagonistas peptídicos de los NK-1R son diferentes y actúan de una manera dependiente de la concentración. Su actividad está ligada a las características estereoquímicas, es decir, a su afinidad por el NK-1R. Después de la unión, los antagonistas bloquean las funciones fisiológicas mediadas por la SP y, por tanto, podrían ser utilizados como diana terapéutica en patologías humanas en las que el sistema SP/NK-1R está implicado y sobreexpresado.

La administración de estos fármacos produce menos efectos secundarios que los citostáticos ya que actúan de forma específica en la diana sobreexpresada por lo que sólo actúan sobre los sistemas alterados con el aumento en la liberación del NP.

Muchos ensayos clínicos han informado de la ausencia de efectos secundarios graves con la administración de antagonistas de los NK-1R en seres humanos, incluso cuando el antagonista se administró a dosis altas (300 mg/día). Así pues, están surgiendo nuevas líneas de investigación para mejorar el tratamiento de enfermedades en las que el sistema SP/ NK-1R está regulado positivamente.

Tabla 19. Ventajas, beneficios y eventos adversos asociados al tratamiento con antagonistas de NK-1R.

Ventajas y Beneficios	Eventos adversos
Dosis bajas (concentraciones a nivel μM) Disminución del crecimiento celular (inhibición de la mitosis celular) Recuperación de la senescencia-apoptosis Bloqueo de la migración celular: metástasis e invasión Bloqueo de la neoangiogénesis Sinergia con tratamientos QT y RT Mejora de la quimiosensibilización con cisplatino Disminución de las dosis de QT y RT? Antiemético y antinauseoso Antidepresivo Neuroprotector Hepatoprotector Nefroprotector Cardioprotector Antiinflamatorio Protector celular (células normales)	Cefaleas Hipo Vértigo Somnolencia

De acuerdo con los datos obtenidos en los estudios preclínicos el uso de antagonistas como antitumorales en terapia oncológica, es bastante prometedor pues inducen la apoptosis en las células tumorales con inhibición en la actividad migratoria y ejercen propiedades antiangiogénicas.

Justificación y pertinencia

1.6 Justificación y Pertinencia

El adenocarcinoma de próstata fue el cáncer más frecuentemente diagnosticado en varones en España en 2015 (33370 casos). Tiene una alta prevalencia y una mortalidad en 2014 de 5855 casos (224). Esta neoplasia lleva asociada una importante morbilidad y limitación de la calidad de vida relacionada con el tratamiento del tumor y en casos avanzados con la aparición de metástasis, que con mayor frecuencia asientan en el hueso.

A nivel internacional, nacional y de nuestra Comunidad Autónoma se han diseñado estrategias para la prevención, el cribado, tratamiento, seguimiento y cuidados del CPr y sus complicaciones (225).

La literatura actual relaciona la expresión de SP/NK-1R con procesos inflamatorios y tumorales en distintos órganos y tejidos de la economía humana, pero hasta la actualidad no se han demostrado su expresión en el CPr.

Existe actualmente una elevada controversia en el uso del PSA como método de detección precoz. También existe cierto grado de variabilidad en las decisiones terapéuticas y el seguimiento, a causa de la frecuente morbilidad postquirúrgica y la baja sensibilidad del PSA.

Las conclusiones de este trabajo pueden aportar nuevos conocimientos en cuanto a la participación del complejo SP/NK-1R en la fisiopatología y la supervivencia asociada al CPr y por tanto, aportar una línea terapéutica en este sentido. Finalmente, podría suponer una actualización en las Guías de práctica clínica en caso de demostrarse su papel como marcador diagnóstico-terapéutico (225).

Preguntas de investigación

1.5 Preguntas de Investigación

El adenocarcinoma de próstata es el tipo más frecuentemente de cáncer en varones. Se sabe poco sobre las causas del CPr aunque se habla de que existen factores relacionados con la edad, la raza, factores endocrinos y factores ambientales.

La compleja fisiopatología de las neoplasias, su relación con mediadores de la inflamación y el papel de la SP y su receptor NK-1R tanto en procesos inflamatorios como en la progresión y metástasis de las neoplasias malignas, nos ha llevado a plantearnos este estudio en el que tratamos de demostrar mediante el empleo de técnicas de inmunohistoquímica la expresión de tanto la SP y el NK-1R, en las células de neoplásicas del CPr.

Hasta el momento la SP no ha sido estudiada en el CPr y, aunque existen trabajos que demuestran la expresión y distribución de la SP en la próstata normal humana y de animales, así como en otros tumores de diferentes localizaciones.

Por todo ello, nos proponemos realizar una evaluación semicuantitativa de la expresión de este undecapéptido y de su receptor en tejido prostático procedente de prostatectomías radicales conservadas en el Archivo de General de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios del Aljarafe con el fin de responder a las siguientes preguntas:

1. ¿Se expresa la SP y NK-1R en el tejido prostático?
2. ¿Cómo se distribuyen y con qué intensidad se expresan estos marcadores en el tejido normal y tumoral en el adenocarcinoma de próstata?

3. ¿Está asociada la expresión de SP/NK-1R con la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia global específica del CPr (SGEC)?

Entendiendo por SLE: el periodo de tiempo que transcurre entre el momento del diagnóstico y la aparición recidiva bioquímica o local y metástasis a distancia; y por SGEC: el periodo de tiempo entre el momento del diagnóstico y el fallecimiento por causa del CPr.

4. ¿Está asociada la expresión de SP/NK-1R con las características histopatológicas y clínicas del CPr?
5. ¿Existe alguna asociación entre la expresión de SP/NK-1R y la expresión de Bcl2 y p53?

Hipótesis

1.6 Hipótesis

1. La expresión inmunohistoquímica (IHQ) de SP/NK-1R medida con la escala de Allred es superior en las células tumorales del CPr que en el tejido prostático normal.
2. La expresión inmunohistoquímica (IHQ) de SP/NK-1R en el CPr se asocia a un aumento del riesgo de recurrencia (recidiva bioquímica o local y/o metástasis a distancia) y de mortalidad asociada a la citada neoplasia, y por tanto disminuye la SLE y la SGEC.
3. La expresión inmunohistoquímica (IHQ) de SP/NK-1R se asocia con las variables histopatológicas del CPr.
4. La expresión de SP/NK-1R se asocia con los grados de expresión de Bcl2 y p53

Objetivos

1.8 Objetivos

1.8.1 General

Analizar mediante técnicas IHQ la expresión, localización y distribución de la SP/NK-1R en el tejido prostático humano normal y tumoral y su asociación con la progresión del CPr.

1.8.2 Específicos

- Comparar la expresión, localización y distribución de SP/NK-1R en el tejido normal y tumoral en el CPr.
- Analizar la asociación entre la expresión de SP/NK-1R y el riesgo de recurrencia y mortalidad asociada al CPr.
- Identificar los factores (histológicos, bioquímicos y moleculares) y el grado de expresión de SP/NK-1R asociados a la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global específica del CPr.
- Determinar el nivel de asociación entre la expresión de SP/NK-1R y los histológicos, bioquímicos y moleculares analizados.

Material y Métodos

2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Población

Todas las muestras analizadas en este proyecto pertenecen a casos custodiados en el archivo general de Anatomía Patológica del HSJDA procedentes de piezas quirúrgicas intervenidas entre el 01/01/2009 hasta el 31/12/2009. Se eligieron muestras de este periodo con el fin de poder usar el material residual de los bloques de parafina sin entrar en riesgo de que se solicitaran nuevas evaluaciones de las piezas por revisión de la terapia y para tener un periodo de seguimiento de 10 años tras la biopsia. Con todo ello se ha tenido la precaución de seleccionar biopsias que tuvieran múltiples bloques, y de no agotar aquellos bloques de parafina de los que se han obtenido los cilindros de tejido para la realización de este estudio.

2.1.1 Criterios de selección

2.1.1.1 Criterios de inclusión

- Biopsia de próstata procedente de prostatectomía radical laparoscópica.
- Material histológico en buen estado de conservación y sin artefactos en su procesamiento. Comprobado sobre el bloque seleccionado y mediante tinción con H-E (técnica de rutina en el diagnóstico anatomopatológico de este tipo de muestras).
- Que quede tejido remanente tanto normal como patológico tanto en el bloque seleccionado como en otros bloques del mismo paciente.

2.1.1.2 Criterios de exclusión

- Pieza con alto riesgo de agotamiento del bloque de biopsia.

- Pieza de prostatectomía con escasa representación tumoral (menos de un 5% del volumen de la pieza) que tras la revisión por dos patólogos sea difícil de detectar tejido tumoral.

2.2 Diseño

Estudio de cohortes retrospectivas mediante estudio anatómico-morfológico semicuantitativo de la expresión y distribución de la SP y su receptor NK-1R con técnicas inmunohistoquímicas y análisis de datos clínicos con seguimiento de la cohorte de casos desde 2009, año en el que se estableció el diagnóstico del adenocarcinoma de próstata hasta junio 2018 o fecha de fallecimiento.

2.3 Ámbito

Pacientes pertenecientes al Área dependiente del Hospital San Juan de Dios del Aljarafe (Bormujos, Sevilla) (HSJDA).

2.4 Periodo de estudio

Se analizaron muestras procedentes de piezas quirúrgicas (prostatectomías radicales vía laparoscópica) del periodo 01/01/2009-31/12/2009 y se siguieron y analizaron los casos hasta el 30/06/2018.

2.4.1 Muestra

2.4.1.1 Tamaño muestral

Se calculó el tamaño muestral mediante la herramienta estadístico-epidemiológica EPIDAT 4.1.

En el periodo de estudio se realizaron unas 60 prostatectomías radicales vía laparoscópica por adenocarcinoma. Por estudios previos en otros tumores, se ha determinado que la proporción de muestras con puntuación igual o superior a 5 (expresión intermedia a fuerte) en la escala de Allred de expresión de la SP a nivel nuclear es del 11.5% en el tejido normal (estroma) y del 55.7% en el tejido tumoral. Aceptando un nivel de confianza del 95% y una potencia del 90%, el tamaño muestral necesario sería de 54 casos (27 de tejido normal y 27 de tejido tumoral). El mismo número de casos se utilizaría para la tinción con anticuerpos frente a NK-1R, ya que las proporciones de expresión a nivel citoplásmico de este receptor son de 3.8% en el tejido normal y de 88.4% en el tejido tumoral; y por tanto la muestra necesaria era menor para encontrar diferencias con significación estadística. Por todo ello, y teniendo en cuenta posibles pérdidas durante el procesamiento de las muestras se decidió tomar un tamaño de muestra de 60 casos.

2.4.1.2 Técnica de muestreo

Se realizó un muestreo aleatorio simple mediante una tabla de números aleatorios. Se aplicó la aleatorización a todos los casos de adenocarcinoma de próstata extirpados vía laparoscópica a lo largo del año 2009 y que cumplieren los criterios de selección.

2.5 Variables de estudio

2.5.1 Dependientes

Hemos definido como variables dependientes el nivel de expresión y distribución de la SP y su receptor NK-1R, exitus, supervivencia, recidiva y metástasis (Anexo 2. Tabla de definición de variables).

2.5.2 Independientes

Entre las variables explicativas seleccionamos, la edad, el diagnóstico histológico, el estadio TNM, el grado de Gleason, los valores plasmáticos de PSA a lo largo del periodo de seguimiento y expresión inmunohistoquímica de los protooncogenes Bcl2 y p53, entre otras (Anexo 2. Tabla de definición de variables).

2.6 Fuentes de datos

Las muestras biológicas proceden del archivo general de Anatomía Patológica del HSJDA.

Los datos clínicos se han extraído de las historias clínicas digitales registradas en las siguientes bases de datos: DIRAYA de Atención Primaria, Estación Clínica de Atención Hospitalaria (Hospital Virgen del Rocío) ambas del Servicio Andaluz de Salud y TiCares (Historia Digital del HSJDA), bases de datos de los laboratorios clínicos del HSJDA y HVR (para la evaluación de los niveles de PSA) y base de datos de informes anatomopatológicos del HSJDA.

2.7 Procesamiento de las muestras

2.7.1 Realización de cortes y preparación de muestras

Una vez seleccionados los casos que cumplieron los criterios de inclusión se localizaron los bloques de parafina que incluían el material histológico a estudiar.



Ilustración 16. Procesador automatizado de muestras histológicas.

Este material histológico procede de prostatectomías radicales laparoscópicas que se procesaron según el protocolo habitual del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios del Aljarafe. Las piezas de biopsia fueron fijadas en formaldehído al 10% e incluidas en parafina mediante procesamiento automatizado (ilustración 17). Una vez

obtenidos los bloques se realizaron cortes de 5 μm con un micrótopo RM2255

(Leica®) a un grosor de 4 μm y se montaron en portaobjetos destinados para

inmunohistoquímica (xilanizados y en periodo de uso). Los cristales se identificaron mediante serie numerada correspondientes al número de identificación unívoco asignado a la muestra quirúrgica en el proceso de solicitud telemático de estudio de biopsias dentro de la Sección de Laboratorio en el módulo de Anatomía Patológica.

2.7.2 Construcción de la matriz de tejido (*Tissue Micro Arrays*, TMA)

Los bloques de parafina de los casos seleccionados se remitieron al Nodo Biobanco del Hospital Universitario Virgen del Rocío-Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) para su procesamiento inmunohistoquímico.



Ilustración 17. Imagen del TMA de próstata.

El proceso comienza con la realización de los cortes con un microtomo RM2255 (Leica®) a un grosor de 4 μ m. Cada una de las secciones de tejido se colocó sobre un portaobjetos y se tiñeron con H-E. Estas secciones permitieron seleccionar la zona de interés de cada bloque para incluirla en la matriz de tejido (TMA) (ilustración 18). Se seleccionaron áreas representativas y se extrajeron cilindros de tejido de

1mm de diámetro y al menos 2 mm de profundidad. Estos cilindros fueron posteriormente colocados de manera ordenada en un nuevo bloque de parafina utilizando el *Manual Tissue Arrayer-1* (MTA-1, Beecher Instruments®). El bloque resultante es una matriz que contiene 60 cilindros de 1 mm de diámetro provenientes de los distintos casos (cada uno representado por duplicado) y separados entre sí por 0,8 mm de distancia. Se cortaron secciones en portaobjetos del TMA en un microtomo a 4 μ m para la

realización de las técnicas inmunohistoquímicas y se montaron en portaobjetos destinados para inmunohistoquímica (xilanizados y en periodo de uso).

2.7.3 Descripción del método inmunohistoquímico

La inmunotinción basada en el uso de estreptavidina-biotina y revelado con diamino-benzidina (DAB), siguiendo las recomendaciones de las fichas técnicas de los anticuerpos se realizó de forma automatizada, utilizando el inmunoteñidor Benchmark XT® de Roche Diagnostics® (ilustración 19). De forma resumida, el procedimiento realizado fue el siguiente:

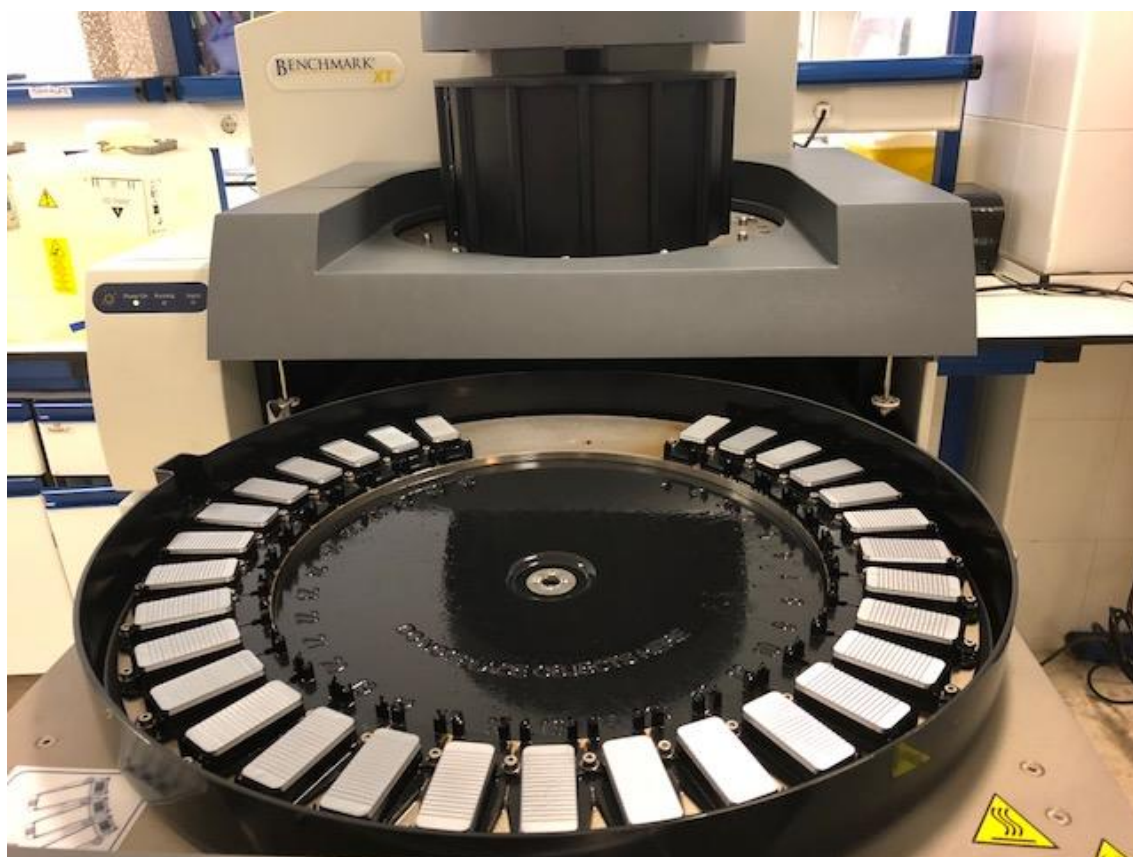


Ilustración 18. Equipo automatizado para tinción inmunohistoquímica.

La aplicación de esta técnica requiere la desparafinación y rehidratación de las muestras. Para la desparafinación, los portaobjetos con los cortes de parafina, se sumergieron en dos baños sucesivos con Xilol durante 10-15 minutos cada uno. Posteriormente, se rehidrataron mediante inmersión en alcoholes de concentración decreciente durante 10 minutos cada uno (100%, 90%, 80%, 70%) y, por último, se lavaron con agua destilada durante 5 minutos.

A continuación, se realizó un pretratamiento para la recuperación antigénica, de acuerdo con las recomendaciones indicadas en las fichas técnicas de los anticuerpos utilizados.

Una vez realizado este paso, se procedió a bloquear la actividad de la peroxidasa endógena presente en las muestras, sumergiéndolas en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos. Posteriormente, para evitar la tinción inespecífica de fondo en una solución de bloqueo (Blocking reagent, Roche®) al 1% para cubrir los sitios de unión inespecíficos.

Las secciones se incubaron con los anticuerpos anti-SP, a concentraciones 1/1500 y anti-NK-1R, a concentraciones 1/500, durante 1 hora (técnica estandarizada en el citado laboratorio para estos anticuerpos). Después de lavar con tampón, se aplicaron los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y el sustrato cromogénico 3,3'-diaminobencidina para desarrollar la inmunoreactividad, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Benchmark XT® de Roche Diagnostics®).

Posteriormente, se procedió a la contratinción y montaje de las secciones. Los núcleos se tiñeron mediante inmersión durante 1 minuto en Hematoxilina de Harris diluida para, después virar la tinción en una solución de carbonato de litio

saturada. Antes de montar las muestras en resina sintética para su observación al microscopio, se deshidrataron mediante inmersión en un batería de alcoholes de concentración creciente hasta llegar al alcohol absoluto, seguido de xilol y montaje. Las secciones se montaron en DPX (BDH Laboratories®) y se guardaron de manera ordenada para dejarlas secar y proceder a su evaluación.

En base a los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se decidió realizar algunas modificaciones para mejorar el protocolo IHQ:

- A todas las muestras se les aplicó un pre-tratamiento térmico con tampón EDTA a pH 9.
- Se utilizó un sistema de detección más sensible (Martin-Lacave I; García-Caballero T, 2011) (226). Una vez incubadas las muestras con el anticuerpo primario, después de lavarlas con PBS, se cubren con el sistema de detección se incuban durante 40 minutos en cámara húmeda.

2.7.4 Valoración e interpretación de los resultados

Las muestras fueron valoradas e interpretadas una a una en colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios del Aljarafe (Bormujos, Sevilla). Para ello, se siguió un sistema ciego de identificación de las muestras en el que no se conoce ningún dato del paciente (edad, diagnóstico anatomopatológico, etc) en el momento de valorar cada muestra. Para cada uno de los 27 casos y 27 controles de este estudio se valoraron de forma sistemática 8 ítems de la histología prostática, tanto para las muestras de SP, NK-1R y los controles negativos. En cada muestra de tejido prostático se valoró la intensidad y la extensión de la tinción para cada uno de

los elementos histológicos ya definidos, empleando para ello una escala semicuantitativa previamente definida por Allred y modificada por Chen con el siguiente sistema de puntuación (227):

- Puntuación de extensión:

Puntuación de Extensión	0	1	2	3	4	5
Proporción de células teñidas	0%	<1%	1%-10%	10%-33%	33%-66%	>66%

- Puntuación de intensidad:

Puntuación de Intensidad	0	1	2	3
Escala de intensidad	Nada	Débil	Intermedia	Fuerte
Escala colorimétrica	Sin tinción	Amarillo claro	Amarillo-marrón	Marrón

- **Puntuación global:** se calcula mediante la suma de las puntuaciones conseguidas en extensión e intensidad. Puede tomar los siguientes valores 0 (negativo) y entre 2 y 8 (positivo).

Tras valorar e interpretar la tinción en cada una de las muestras se completó la información con la correspondiente HC para realizar su análisis posterior por estratos. Se obtuvieron fotografías de las muestras más representativas mediante un microscopio Leica® DMD108, dotado con objetivos de diferentes aumentos (4X, 10X, 20X, 40X, 60X) y acoplado a una cámara fotográfica digital. A continuación, se expone la hoja de recogida de resultados empleada para cada muestra.

2.7.5 Limitaciones de los instrumentos de medida

Entre las limitaciones en la evaluación de las muestras nos encontramos con que la valoración del grado histológico adolece de tener una alta variabilidad inter-observador. Para evitar este sesgo, se realizó la lectura de las muestras

mediante dos observadores independientes (patólogos de amplia experiencia profesional). En los casos en que los que se detectó algún grado de discordancia en las evaluaciones, éstas fueron resueltas un tercer patólogo.

2.8 Análisis estadístico

Todos los datos se registraron en una hoja de cálculo Excel® (*Microsoft Corporation*, Redmond, Washington, Estados Unidos). Una vez depurados los datos. Se analizaron mediante el programa estadístico IBM® *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Statistics®)* versión 22. Se hizo una exploración de los datos y finalmente se realizó el análisis estadístico propiamente dicho cuya metodología se describe a continuación:

2.8.1 Análisis univariante

El estudio estadístico descriptivo tiene la finalidad de organizar, representar gráficamente, y resumir adecuadamente la información recogida sobre las variables de estudio. La información de tipo cualitativa y la de tipo cuantitativa discreta ha sido organizada y resumida en tablas de frecuencias en las que se ha indicado el número de casos y los porcentajes de cada categoría. La información cuantitativa de tipo continuo se ha organizado en tablas de frecuencias, se ha representado a través de gráficos específicos (diagramas de cajas) y se ha resumido con medidas estadísticas que nos informan sobre la centralización (medianas) y la dispersión (recorridos intercuartílicos, RIC, que se ha expresado mediante los percentiles 25 y 75) de los datos. Este estudio descriptivo nos ha permitido obtener una buena información sobre las características de nuestra muestra de pacientes.

Se realizó un análisis de cada una de las variables cuyos resultados se expresaron según la naturaleza de cada una de ellas. Así las variables cualitativas se expresaron en número (frecuencias absolutas) y porcentajes, junto a sus intervalos de confianza al 95%; y las variables cuantitativas, cuya distribución fue asimétrica (no normal), se resumieron mediante su mediana (Med) y el recorrido intercuartílico (RIC). Para determinar la simetría de las distribuciones de las variables cuantitativas utilizamos el test de Kolmogorov-Smirnov.

2.8.2 Análisis bivalente

Se realizó una comparación entre variables mediante las técnicas estadísticas correspondientes a la naturaleza de las mismas. Para la comparación de dos variables cualitativas utilizamos tablas de contingencia y el test de ji-cuadrado, o el test de Fisher en los casos en los que alguna de las celdas de la tabla de contingencia contuviese una frecuencia esperada menor de 5.

Para comparar una variable numérica con una variable dicotómica usamos el test de la T de Student, si la variable continua seguía una distribución normal (Test de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk), o en caso contrario el test de la U de Mann-Whitney (test no paramétrico). En el caso de que la variable cualitativa tuviese tres o más categorías usamos el test de ANOVA o el de Kruskal-Wallis según la bondad del ajuste de la distribución de la variable continua.

2.8.3 Análisis de supervivencia

Se realizó un análisis de supervivencia univariado mediante curvas de Kaplan-Meier, con el fin de predecir el comportamiento de la variable dependiente (tiempo hasta recidiva) a partir de la variable independiente principal del estudio expresión de SP a nivel nuclear. Se obtuvieron las probabilidades de supervivencia, la mediana de supervivencia y los cuartiles. Se generaron estadísticos separados por grupo de estudio (tejido normal vs tejido tumoral) y se representaron las funciones de supervivencia para cada uno de estos grupos.

Test Log-Rank. El test Log-Rank se utilizó para comparar la igualdad de las distribuciones del tiempo hasta que aparece la recidiva entre los dos grupos de tratamiento.

Regresión de Cox. La regresión de Cox (riesgo proporcional) se utilizó para crear modelos de tiempos de supervivencia incluyendo hipotéticas variables predictoras (covariables) tanto categóricas como continuas. Para las variables seleccionadas por el mismo se calcularon *hazard ratios* e intervalos de confianza al 95%, una vez validados los requisitos de aplicación.

Tras el análisis univariante previo se identificaron aquellas variables relacionadas con el tiempo hasta que se produce la recidiva. Con estas variables se realizó un análisis multivariante para la selección del modelo final. De esta forma, se examinó la relación entre el tiempo hasta que se produce el evento y cada variable, controlando por el resto de variables incluidas en el modelo. En el análisis univariado previo al análisis multivariante se ha considerado un nivel de significación de 0,15. Para las variables seleccionadas por el mismo, se

calcularon *hazard ratios* e intervalos de confianza al 95%, una vez validados los requisitos de aplicación.

En todos los contrastes de hipótesis se consideró un nivel de significación α del 5% ($p < 0,05$)

2.9 Consideraciones bioéticas

Este proyecto ha sido aprobado por el Comité de Bioética de la Investigación (CEIC) de los Hospitales Virgen Macarena-Virgen del Rocío, que son nuestros hospitales de referencia. El certificado de aprobación está disponible en el Anexo I.

Estudio sujeto a los principios adoptados por la 18ª Asamblea Médica Mundial (Helsinki, 1964) y posteriores revisiones. Se han seguido las normas de Buena Práctica Clínica dictadas por la Conferencia Internacional de Armonización de Directrices sobre Buena Práctica Clínica y los requisitos de las Autoridades Sanitarias Españolas establecidos en el Real Decreto 711/2002 de 19 de julio.

Los investigadores aseguraron la confidencialidad de los datos y velaron por mantener el anonimato de los pacientes cuyos datos clínicos se incluyeron en el análisis, dando cumplimiento inicialmente a la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y posteriormente siguiendo las recomendaciones del REGLAMENTO (UE) 2016/679 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 27 de abril de 2016 relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos y por el que se deroga la

Directiva 95/46/CE (Reglamento general de protección de datos). Se trabajará con dos bases de datos (BD). Con esta finalidad se trabajó con dos bases de datos (BD) que se custodiaron en archivos diferentes. En la BD-1 se relacionó el NId (número de identificación del paciente) con los datos personales, siendo el NId un número unívoco para cada paciente. En la BD-2 se relacionó el NId con los datos clínicos de los pacientes.

Resultados

3 RESULTADOS

2.10 Análisis exploratorio de la muestra

Se analizaron 60 muestras (30 de tejido normal y 30 de tejido tumoral) procedentes de 30 pacientes intervenidos de adenocarcinoma de próstata por vía laparoscópica.

2.11 Análisis univariante

La edad mediana (RIC) de los pacientes fue de 65,0 (58,0 ; 68,2) años. La descripción de las variables cuantitativas se puede ver en las tablas 20 y 21.

Durante los 10 años de seguimiento de los pacientes no se produjo ningún exitus por causas relacionadas con el adenocarcinoma de próstata ni se detectaron metástasis a distancia.

Tabla 20. Descripción de las variables cuantitativas.

Variable	N	mín	Máx	Mediana (P25 ; P75)
Edad al diagnóstico (años)	60	44,9	72,2	65,0 (58,0 ; 68,2)
Edad hasta fin de seguimiento (meses)	60	54,2	81,7	73,2 (67,2 ; 77,4)
Supervivencia hasta recidiva (meses)	60	7,2	115,2	111,1 (104,0 ; 113,6)
SP Global Citoplasma	60	3	8	5,0 (4,0 ; 6,0)
SP Global Núcleo	60	0	8	4,0 (3,0 ; 4,8)
SP Global Estroma	60	0	7	3,0 (3,0 ; 4,0)
NK-1R Global Citoplasma	60	2	8	4,0 (3,0 ; 6,0)
NK-1R Global Núcleo	60	0	6	0,0 (0,0 ; 3,0)

SP Global Citoplasma: puntuación global Allred de la expresión de la sustancia p en el citoplasma de las células tumorales; SP Global Núcleo: puntuación global Allred de la expresión de la sustancia p en el núcleo de las células tumorales; SP Global Estroma: puntuación global Allred de la expresión de la sustancia p en el citoplasma de las células estromales; NK-1R Global Citoplasma: puntuación global Allred de la expresión de la NK-1R en el citoplasma de las células tumorales; NK-1R Global Núcleo: puntuación global Allred de la expresión de la NK-1R en el núcleo de las células tumorales

Tabla 21. Descripción de las variables cualitativas de los pacientes analizados.

Variable	N	%	IC 95%
Tumor (pT, TNM)			
pT2	52	86,7	(69,3 ; 96,3)
pT3a	8	13,3	(3,8 ; 30,7)
Patrón de Gleason principal			
Gleason 3	50	83,3	(65,3 ; 94,4)
Gleason 4	10	16,7	(5,6 ; 34,7)
Patrón de Gleason secundario			
Gleason 2	4	6,7	(0,8 ; 22,1)
Gleason 3	42	70	(51,9 ; 88,1)
Gleason 4	14	23,3	(6,5 ; 40,1)
Puntuación de Gleason global			
Gleason 5 (3+2)	4	6,7	(0,8 ; 22,1)
Gleason 6 (3+3)	32	53,3	(33,8 ; 72,9)
Gleason 7 (3+4)	14	23,3	(6,5 ; 40,1)
Gleason 7 (4+3)	10	16,7	(5,6 ; 34,7)
Infiltración del margen radial	26	43,3	(23,9 ; 62,7)
Infiltración del ápex	10	16,7	(5,6 ; 34,7)
Expresión IHQ de Bcl2	23	38,3	(25,2 ; 51,5)
Expresión IHQ de p53			
Negativa	38	63,3	(50,3 ; 76,4)
Débil	17	28,3	(16,1 ; 40,6)
Intermedia	5	8,3	(2,8 ; 18,4)
Recidiva bioquímica	12	20	(7,7 ; 38,6)
Radioterapia	10	16,7	(5,6 ; 34,7)
Metastásis	0	0	
SLE>1 año	58	96,7	(88,5 ; 99,6)
SLE>5 años	52	86,7	(77,2 ; 96,1)
SLE≥10 años	36	60	(46,8 ; 73,2)

SLE: Supervivencia libre de enfermedad; IHQ: inmunohistoquímica.

El patrón de Gleason más frecuente fue el 6 (3+3) que se describió en 32 (53,3%) de los casos, seguido del 7 (3+4) en 14 (23,3%) de los casos. El componente pT de la Clasificación pTNM más frecuente fue el pT2 en 52 (86,7%) de los casos. De todos los pacientes, 12 (20%) desarrollaron recidiva bioquímica, de los que 10 (16,7%) recibieron radioterapia durante los 10 años de seguimiento. El 13,3% de los pacientes analizados presentaron recidiva

bioquímica en los primeros 5 años de seguimiento y el 40% antes de los 10 años (tabla 21).

El valor de PSA prequirúrgico mediano (RIC) fue de 6,4 (4,8 ; 7,2) ng/ml, con un mínimo de 0,1 y un máximo de 12,6 ng/ml. Los resultados del análisis de los niveles de PSA séricos (ng/ml) a lo largo de los 10 años de seguimiento se expresan en la tabla 22. Para comprobar si había diferencias con significación entre los valores obtenidos en cada analítica anual se realizó el test de Friedman (test no paramétrico para medidas repetidas) y el test de Wilcoxon (test no paramétrico para variables apareadas) que permitieron detectar diferencias estadísticamente significativa entre los valores del PSA a lo largo del seguimiento de los pacientes ($p= 0,0005$).

Tabla 22. Valores de PSA a lo largo del periodo de seguimiento.

Niveles de PSA	N	Mínimo	Máximo	Mediana (P25 ; P75)
PSA prequirúrgico, (ng/ml)	60	0,100	12,600	6,415 (4,840 ; 7,220)
PSA postquirúrgico, (ng/ml)	60	0,000	1,380	0,020 (0,010 ; 0,030)
PSA 2010, (ng/ml)	60	0,000	0,470	0,013 (0,010 ; 0,040)
PSA 2011, (ng/ml)	60	0,000	0,240	0,010 (0,010 ; 0,030)
PSA 2012, (ng/ml)	60	0,000	0,420	0,010 (0,010 ; 0,020)
PSA 2013, (ng/ml)	60	0,009	0,410	0,020 (0,010 ; 0,040)
PSA 2014, (ng/ml)	60	0,009	0,330	0,020 (0,009 ; 0,040)
PSA 2015, (ng/ml)	58	0,009	0,690	0,010 (0,009 ; 0,030)
PSA 2016, (ng/ml)	58	0,009	2,540	0,015 (0,010 ; 0,040)
PSA 2017, (ng/ml)	58	0,009	5,000	0,010 (0,010 ; 0,020)
PSA 2018, (ng/ml)	55	0,000	0,310	0,010 (0,010 ; 0,020)

2.12 Análisis univariante de la expresión inmunohistoquímica con anticuerpos anti SP y anti NK-1R

El análisis de las muestras puso de manifiesto que las células tumorales presentaron una tinción positiva para SP/NK-1R, entendiendo como tinción positiva cuando la expresión inmunohistoquímica de SP/NK-1R alcanzaba una puntuación global en la escala de Allred, igual o superior a 2 puntos. Así la tinción con SP/NK-1R a nivel citoplásmico fue positiva en la totalidad de los casos, mientras que a nivel nuclear, la puntuación de SP fue del 96,7% (ilustración 19) y la de NK-1R del 28,3% (ilustraciones 20-23).

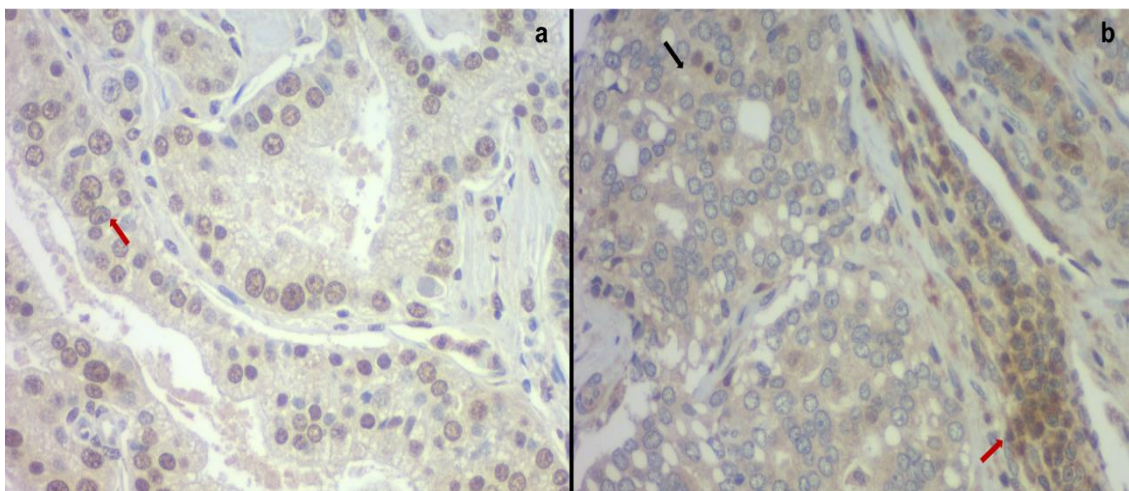


Ilustración 19. Tinción de SP. a) Flecha roja: tinción nuclear moderada de células neoplásicas. b) Flecha negra: Tinción citoplásmica difusa débil de células tumorales; flecha roja: Expresión intensa nuclear.

Cuando agrupamos la puntuación global (Allred) de la expresión de SP/NK-1R en dos categorías que distinguen la expresión nula-débil (puntuación<4) de la intensa o fuerte (puntuación≥4), encontramos que el 93% de las células tumorales expresaban SP a nivel citoplásmico de forma intensa o

fuerte, y sólo el 60% a nivel nuclear. A nivel del estroma peritumoral, sólo el 37% de los caso la expresaba de forma intensa. Por otro lado, la expresión de NK-1R de forma intensa sólo se alcanzó en el 60% de los citoplasmas de las células tumorales y en el 23% de los núcleos de las mismas.

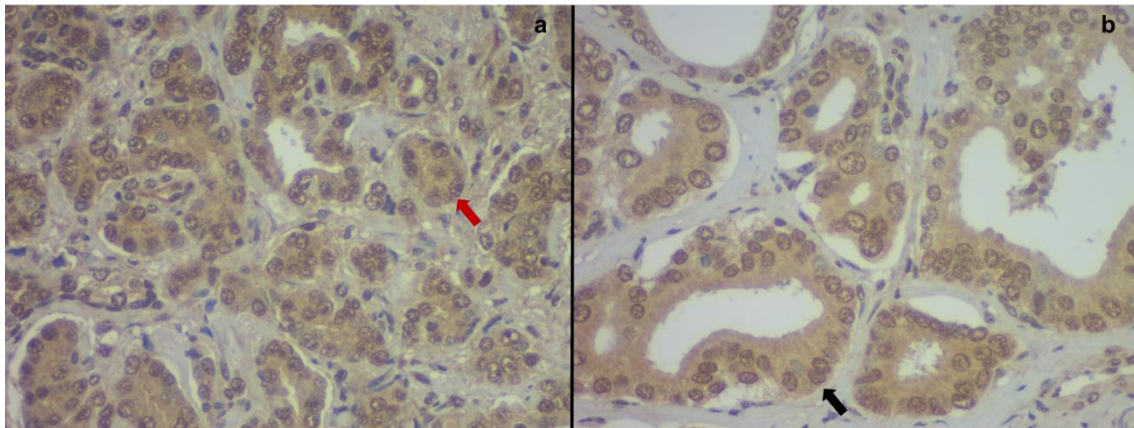


Ilustración 20. Tinción de SP. a) Flecha roja: glándulas desorganizadas, tinción citoplásmica y nuclear intermedias y nucléolos negativos de células neoplásicas. b) Flecha negra: Tinción citoplásmica difusa intermedia y nuclear intensa de células tumorales. Comparar la organización glandular de a y b.

A nivel intracelular la distribución de la SP era predominantemente citoplasmática aunque también podía observarse en la membrana y en el núcleo, así como combinaciones de los tres. Estos resultados están en consonancia con los datos obtenidos en el tejido sano. La tinción de SP se distribuye por las áreas con mayor densidad de mitosis, tanto en tejido sano como en tejido tumoral.

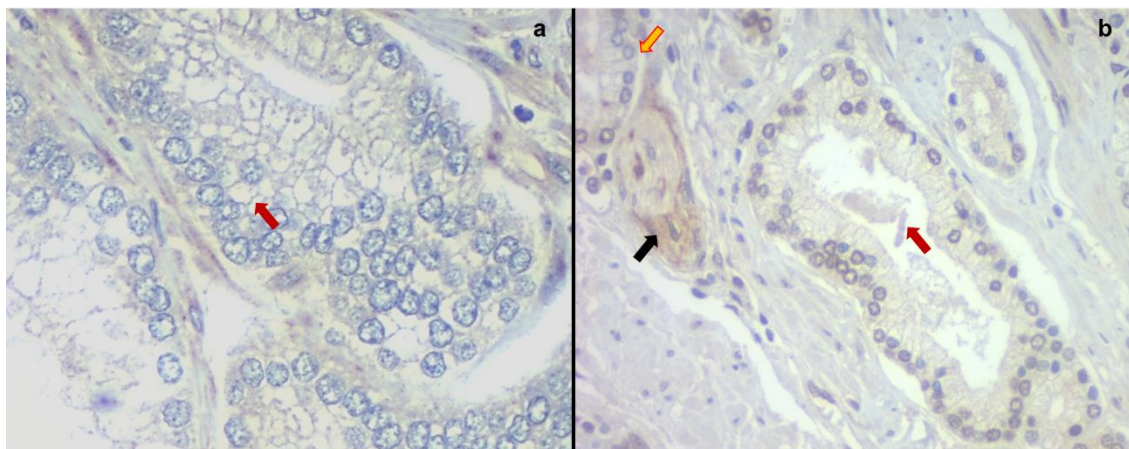


Ilustración 21. Tinción de NK-1R con distribución de membrana. a) Flecha roja: Tinción débil de membrana y negativa a nivel nuclear. b) Flecha negra: nervio; Flecha naranja: invasión perineural; flecha roja: cristaloides.

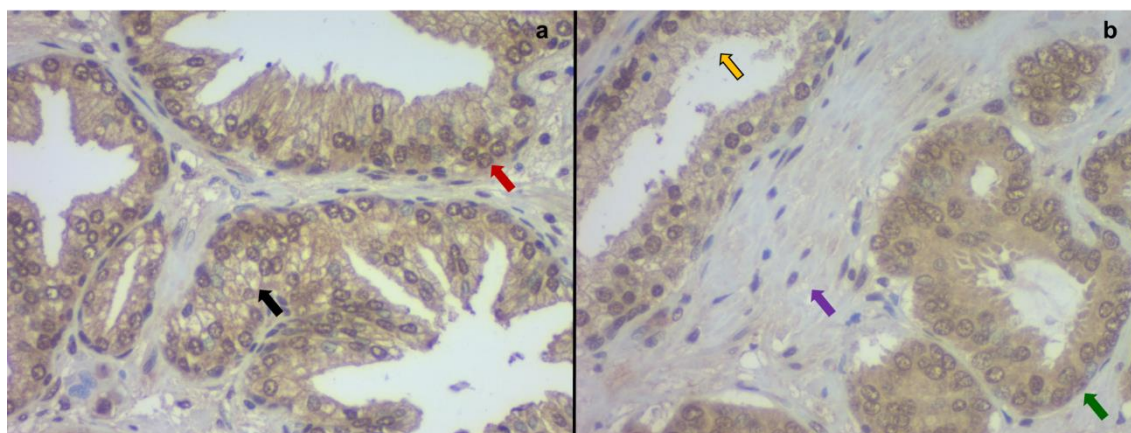


Ilustración 22. Tinción de NK-1R. a) Flecha roja: Tinción intermedia reticular a nivel nuclear. Observar la desorganización nuclear; Flecha negra: Tinción de membrana intermedia de células neoplásicas. b) Flecha verde: Tinción citoplásmica difusa y nuclear débil-intermedia de células tumorales; Flecha morada: nervio; Flecha amarilla: Tinción débil de membrana e intensa de núcleos. Comparar el aspecto entre glándula amarilla y verde.

La **intensidad** de la inmunotinción con anticuerpos anti-SP y anti-NK-1R a nivel citoplásmico y nuclear en las células neoplásicas fue mínimamente más elevada que en el tejido normal, siendo algo más predominante en el núcleo, aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística ($p=0,595$ y $0,430$, respectivamente). Las células estromales se comportaron de igual manera en los dos tipos de tejido ($p=0,999$) (tabla 23).

Tabla 23. Valoración de la intensidad de tinción inmunohistoquímica (Criterios de Allred con anticuerpos anti-SP).

Puntuación de Intensidad, N (%)	0 Nada	1 Débil	2 Intermedia	3 Fuerte
Tejido tumoral				
Citoplasma	0	13 (43,3)	16 (53,3)	1 (3,3)
Núcleo	0	13 (43,3)	15 (50,0)	2 (6,7)
Estroma	2 (6,7)	22 (73,3)	6 (20,0)	0
Tejido normal				
Citoplasma	0	14 (46,7)	16 (53,3)	0
Núcleo	2 (6,7)	15 (50,0)	11 (36,7)	2 (6,7)
Estroma	2 (6,7)	22 (73,3)	6 (20,0)	0

En cuanto a la **extensión** de la inmunotinción con anticuerpos anti-SP y anti-NK-1R a nivel citoplásmico y nuclear en las células neoplásicas y estromales del tejido tumoral y normal, se ha puesto de manifiesto que existe una asociación estadísticamente significativa entre la neoplasia y una mayor extensión en su tinción ($p=0,0005$, $p=0,043$ y $p=0,004$; respectivamente) (tabla 24).

Tabla 24. Valoración de la extensión de tinción inmunohistoquímica (Criterios de Allred) con anticuerpos anti-SP.

Puntuación de Extensión, N (%)	0	1	2	3	4	5
Proporción de células teñidas	0%	<1%	1%-10%	10%-33%	33%-66%	>66%
Tejido tumoral						
Citoplasma	0	0	0	10 (33,3)	14 (45,7)	6 (20,0)
Núcleo	0	4 (13,3)	13 (43,3)	7 (23,3)	0	6 (20,0)
Estroma	2 (6,7)	0	17 (56,7)	6 (20,0)	0	5 (16,7)
Tejido normal						
Citoplasma	0	0	9 (30,0)	15 (50,0)	5 (16,7)	1 (3,3)
Núcleo	2 (6,7)	6 (20,0)	13 (43,3)	6 (20,0)	3 (10,0)	0
Estroma	2 (6,7)	8 (26,6)	14 (46,7)	4 (13,3)	2 (6,7)	0

La **intensidad** de la inmunotinción con NK-1R fue superior en núcleo y citoplasma de las células tumorales, pero mientras en la tinción nuclear se demostró una asociación con significación estadística ($p=0,045$), en el citoplasma no fue así ($p=0,211$) (tabla 25).

Tabla 25. Valoración de la intensidad de tinción inmunohistoquímica (Criterios de Allred) con anticuerpos anti-NK-1R.

Puntuación de Intensidad, N (%)	0 Nada	1 Débil	2 Intermedia	3 Fuerte
Tejido tumoral				
Citoplasma	0	17 (56,7)	11 (36,7)	2 (6,7)
Núcleo	19 (63,3)	0	3 (10,0)	8 (26,7)
Tejido normal				
Citoplasma	0	22 (73,3)	8 (26,7)	0
Núcleo	24 (80,0)	2 (6,7)	3 (10,0)	1 (3,3)

La **extensión** de la inmunotinción con anticuerpos anti NK-1R fue muy alta a nivel del citoplasma de las células tumorales y algo menos en el núcleo de las mismas respecto al tejido normal. Mientras en el citoplasma se demostraron

diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0005$), en el núcleo no se encontró dicha asociación ($p=0,100$) (tabla 26).

Tabla 26. Valoración de la extensión de tinción inmunohistoquímica (Criterios de Allred) con anticuerpos anti-NK-1R.

Puntuación de Extensión, N (%)	0	1	2	3	4	5
Proporción de células teñidas	0%	<1%	1%-10%	10%-33%	33%-66%	>66%
Tejido tumoral						
Citoplasma	0	0	0	1 (3,3)	0	29 (96,7)
Núcleo	19 (63,3)	0	6 (20,0)	5 (16,7)	0	0
Tejido normal						
Citoplasma	0	11 (36,7)	18 (60,0)	1 (3,3)	0	0
Núcleo	24 (80,0)	2 (6,7)	3 (10,0)	1 (3,3)	0	0

Aunque el número de casos que expresaban NK-1R a nivel nuclear fue bajo, se detectó que su expresión coincidía con los casos que presentaron recidiva bioquímica, lo que parece poner de manifiesto que es el receptor NK-1R a nivel nuclear quien induce el proceso de proliferación celular.

2.13 Análisis bivariante

Se realizó un análisis bivariante para comparar la puntuación global (Allred) de la expresión de la SP/NK-1R entre el tejido tumoral y el tejido normal. Se puso de manifiesto que el tejido tumoral expresó tanto la SP como su receptor NK-1R en mayor grado que en el tejido normal (tabla 25). La expresión IHQ de SP/NK-1R fue superior en el tejido tumoral que en el normal, alcanzándose diferencias con significación estadística en la expresión de ambas a nivel citoplásmico y estromal y no a nivel nuclear (tabla 27).

Tabla 27. Distribución de la expresión global (Allred) de SP/NK-1R entre tejido normal y tumoral.

Variable, Med (RIC)	Tipo de tejido			valor p
	Global N= 60	Normal N= 30	Tumoral N= 30	
SP Global Citoplasma	5,0 (4,0 ; 6,0)	4,0 (4,0 ; 5,0)	5,0 (5,0 ; 6,0)	<0,001
SP Global Núcleo	4,0 (3,0 ; 4,5)	3,5 (3,0 ; 4,0)	4,0 (3,0 ; 5,0)	0,064
SP Global Estroma	3,0 (3,0 ; 4,0)	3,0 (2,0 ; 4,0)	3,0 (3,0 ; 4,0)	0,031
SP NK-1R Citoplasma	4,0 (3,0 ; 6,0)	3,0 (2,0 ; 3,0)	6,0 (6,0 ; 7,0)	<0,001
SP NK-1R Núcleo	0 (0 ; 3,0)	0,0 (0,0 ; 0,0)	0,0 (0,0 ; 5,0)	0,069

Med: Mediana; RIC: recorrido intercuartílico expresado como (P25 ; P75), Prueba de contraste: U de Mann-Whitney

De igual manera, los tumores con puntuación de Gleason ≥ 7 expresan más SP/NK-1R en el tejido tumoral que en el tejido normal, aunque no se alcanzó la significación estadística con la expresión citoplásmica de NK-1R ($p= 0,632$). Los tumores con mayor puntuación de Gleason presentaron más recidivas que los de puntuación igual o inferior a 6. Esto ocurre igualmente con la supervivencia libre de enfermedad a 5 y 10 años, aunque a 5 años no se alcanza la significación estadística (tabla 28).

Tabla 28. Distribución de las variables según la puntuación de Gleason ($\leq 6/\geq 7$).

Variable	Global N= 60	Gleason		valor p
		≤ 6 N= 36	≥ 7 N= 24	
SP Global Citoplasma, Med (RIC)	5,0 (5,0 ; 6,0)	5,0 (4,0 ; 5,0)	5,0 (4,0 ; 6,0)	0,198
SP Global Núcleo, Med (RIC)	4,0 (3,0 ; 5,0)	4,0 (3,0 ; 4,0)	4,0 (3,0 ; 6,0)	0,013
SP Global Estroma, Med (RIC)	3,0 (3,0 ; 4,0)	3,0 (2,5 ; 3,0)	4,0 (3,0 ; 5,0)	0,0005
SP NK1-R Citoplasma, Med (RIC)	6,0 (6,0 ; 7,0)	4,0 (3,0 ; 6,0)	5,0 (3,0 ; 6,0)	0,632
SP NK1-R Núcleo, Med (RIC)	0 (0 ; 3,0)	0,0 (0,0 ; 0,0)	3,0 (0,0 ; 5,0)	0,0005
PSA prequirúrgico (ng/dl), Med (RIC)				0,017
≤ 4	8 (13,3)	8 (22,2)	0 (0,0)	
> 4	52 (86,7)	28 (77,8)	24 (100)	
Recidiva bioquímica, N (%)	12 (20,0)	2 (5,6)	10 (41,7)	0,001
SLE 1 año, N (%)				0,156
Recidiva	2 (3,3)	0 (0,0)	2 (8,3)	
No recidiva	58 (96,7)	36 (100)	22 (91,7)	
SLE 5 años, N (%)				0,05
Recidiva	8 (13,3)	2 (5,6)	6 (25,0)	
No recidiva	52 (86,7)	34 (94,4)	18 (75,0)	
SLE 10 años, N (%)				0,0005
Recidiva	24 (40,0)	6 (16,7)	18 (75,0)	
No recidiva	36 (60,0)	30 (83,3)	6 (25,0)	
Expresión IHQ Bcl2, N (%)	23 (38,3)	14 (38,9)	9 (37,5)	0,999
Expresión IHQ p53, N (%)	22 (36,7)	15 (41,7)	7 (29,2)	0,325

La **expresión global de SP** fue mayor a nivel nuclear y citoplasmático tanto en las células tumorales como en las estromales en los casos en los que hubo recidiva bioquímica, siendo esta asociación estadísticamente significativa. Por otro lado, la **puntuación global de NK-1R** obtuvo resultados muy diferentes tanto a nivel citoplásmico como nuclear. A nivel citoplásmico, no se demostró una asociación estadísticamente significativa con la presencia de recidiva bioquímica. En cuanto a la tinción nuclear con NK-1R, la puntuación fue superior en los casos en los que la recidiva bioquímica estuvo ausente, siendo esta asociación estadísticamente significativa (tabla 29).

Tabla 29. Expresión (puntuación global Allred) de la SP/NK-1R en relación a la presencia de recidiva bioquímica.

Variable, Med (RIC)	Recidiva Bioquímica			valor p
	Global N= 60	Negativa N= 48	Positiva N= 12	
SP Global Citoplasma	5,0 (4,0 ; 6,0)	5,0 (4,0 ; 5,0)	6,0 (5,0 ; 7,0)	0,003
SP Global Núcleo	4,0 (3,0 ; 4,5)	3,5 (3,0 ; 4,0)	6,0 (5,0 ; 7,0)	0,0005
SP Global Estroma	3,0 (3,0 ; 4,0)	3,0 (3,0 ; 3,0)	5,0 (4,5 ; 6,0)	0,0005
SP NK1-R Citoplasma	4,0 (3,0 ; 6,0)	4,0 (3,0 ; 6,0)	5,0 (3,5 ; 6,5)	0,329
SP NK1-R Núcleo	0 (0 ; 3,0)	0,0 (0,0 ; 0,0)	4,5 (0,0 ; 5,0)	0,0005

Med: Mediana; RIC: recorrido intercuartílico expresado como (P25 ; P75).
Prueba de contraste: U de Mann-Whitney

Cuando agrupamos la **intensidad** de la expresión de SP y NK-1R en las categorías nula-débil y fuerte-intensa, encontramos que la recidiva bioquímica está asociada de manera estadísticamente significativa con la expresión fuerte-intensa de NK-1R en el núcleo de las células tumorales y con la expresión de SP en las células estromales (tabla 30). No se detectaron asociaciones entre la intensidad de la inmunotinción de la SP en citoplasma, núcleo ni NK-1R a nivel citoplásmico con el desarrollo de recidiva bioquímica (tabla 30).

Tabla 30. Distribución de la intensidad de SP/NK-1R con la aparición de recidiva bioquímica a lo largo del seguimiento.

Intensidad, N (%)	Recidiva bioquímica			valor p
	Global N= 60	Negativa N= 48	Positiva N= 12	
SP Global Citoplasma				0,519
Nula-Débil	27(45,0)	23 (47,9)	4 (33,3)	
Fuerte-Intensa	33 (55,0)	25 (52,1)	8 (66,7)	

Intensidad, N (%)	Global	Recidiva bioquímica		valor p
		Negativa	Positiva	
	N= 60	N= 48	N= 12	
SP Global Núcleo				0,999
Nula-Débil	30 (50,0)	24 (50,0)	6 (50,0)	
Fuerte-Intensa	30 (50,0)	24 (50,0)	6 (50,0)	
SP Global Estroma				0,036
Nula-Débil	48 (80,0)	41 (85,4)	7 (58,3)	
Fuerte-Intensa	12 (20,0)	7 (14,6)	5 (41,7)	
NK-1R Global Citoplasma				0,223
Nula-Débil	39 (65,0)	33 (68,8)	6 (50,0)	
Fuerte-Intensa	21 (35,0)	15 (31,3)	6 (50,0)	
NK-1R Global Núcleo				0,003
Nula-Débil	45 (75,0)	40 (83,3)	5 (41,7)	
Fuerte-Intensa	15 (25,0)	8 (16,7)	7 (58,3)	

Se ha puesto de manifiesto que existe una asociación estadísticamente significativa entre la intensidad y extensión de la inmunotinción de SP/NK-1R con la presencia de recidiva bioquímica a nivel del núcleo de las células tumorales ($p= 0,182$), pero no fue así a nivel del citoplasma ($p= 0,001$) (tablas 30 y 31).

Tabla 31. Intensidad de la inmunotinción de SP/NK-1R en citoplasma, núcleo y estroma de los adenocarcinomas de próstata.

Extensión, N (%)	Global	Recidiva bioquímica		valor p
		Negativa	Positiva	
	N= 60	N= 48	N= 12	
SP Global Citoplasma				0,182
Extensión \leq 10%	9 (15,0)	9 (18,0)	0 (0,0)	
Extensión $>$ 10%	51 (85,0)	39 (81,3)	12 (100)	
SP Global Núcleo				0,0005
Extensión \leq 10%	38 (63,3)	38 (79,2)	0 (0,0)	
Extensión $>$ 10%	22 (36,7)	10 (20,8)	12 (100)	
SP Global Estroma				0,0005
Extensión \leq 10%	43 (71,7)	42 (87,5)	1 (8,3)	
Extensión $>$ 10%	17 (28,3)	6 (12,5)	11 (91,7)	
NK-1R Global Citoplasma				0,605
Extensión \leq 10%	29 (48,3)	24 (50,0)	5 (41,7)	

Extensión, N (%)	Global N= 60	Recidiva bioquímica		valor p
		Negativa N= 48	Positiva N= 12	
Extensión>10%	31 (51,7)	24 (50,0)	7 (58,3)	
NK-1R Global Núcleo				0,088
Extensión≤10%	54 (90,0)	45 (93,8)	9 (75,0)	
Extensión>10%	6 (10,0)	3 (6,3)	3 (25,0)	

No se ha encontrado asociación estadísticamente significativa entre la expresión inmunohistoquímica para los oncogenes Bcl-2 y p53 y el desarrollo de recidiva bioquímica (tabla 32).

Tabla 32. Expresión de Bcl-2 y p53 dependiendo la presencia de recidiva bioquímica.

Variable, N (%)	Global N= 60	Recidiva bioquímica		valor p
		Negativa N= 48	Positiva N= 12	
Bcl2				0,752
Negativa	37 (61,7)	29 (60,4)	8 (66,7)	
Positiva	23 (38,3)	19 (39,6)	4 (33,3)	
p53				0,909
Negativa	38 (63,3)	31 (64,6)	7 (58,3)	
Débil	17 (28,3)	13 (27,1)	4 (33,3)	
Intermedia	5 (8,3)	4 (8,3)	1 (8,3)	

Con el fin de conocer si existía una asociación entre la expresión IHQ de la SP/NK-1R con la expresión IHQ de Bcl2 y p53, se diseñaron las correspondientes tablas de contingencia y aplicamos el test de ji cuadrado de Pearson o su variante el test de Fisher para las tablas con alguna casilla menor a 5 sujetos. El resultado de dicho análisis se expresa en las tablas 33 y 34.

En los tumores con Bcl2 positiva la expresión de NK-1R a nivel citoplásmico es más alta, siendo esta asociación estadísticamente significativa.

Esta asociación no ha podido ser demostrada con la SP/NK-1R en núcleo ni con SP en el citoplasma o en células estromales (tabla 33).

Tabla 33. Análisis bivariante de la expresión inmunohistoquímica de SP/NK-1R y Bcl2.

Variable, N (%)	Expresión IHQ Bcl2			valor p
	Global N= 60	Negativa N= 37	Positiva N= 23	
SP Global Citoplasma				0,288
Nula-Débil	4 (6,7))	4 (10,8)	0 (0,0)	
Fuerte-Intensa	56 (93,3)	33 (89,2)	23 (100)	
SP Global Núcleo				0,083
Nula-Débil	24 (40,0)	18 (48,6)	6 (26,1)	
Fuerte-Intensa	36 (60,0)	19 (51,4)	17 (73,9)	
SP Global Estroma				0,157
Nula-Débil	38 (63,3)	26 (70,3)	12 (52,2)	
Fuerte-Intensa	22 (36,7)	11 (29,7)	11 (47,8)	
NK-1R Global Citoplasma				0,001
Nula-Débil	24 (40,0)	21 (56,8)	3 (13,0)	
Fuerte-Intensa	36 (60,0)	16 (43,2)	20 (87,0)	
NK-1R Global Núcleo				0,691
Nula-Débil	46 (76,7)	29 (78,4)	17 (73,9)	
Fuerte-Intensa	14 (23,3)	8 (21,6)	6 (26,1)	

En las muestras estudiadas, la expresión de SP a nivel nuclear y de NK-1R a nivel del citoplasma se asocia a niveles intensos de expresión de p53, siendo esta relación estadísticamente significativa (tabla 34).

Tabla 34. Análisis bivariante de la expresión inmunohistoquímica de SP/NK-1R y p53.

Variable, N (%)	Expresión IHQ p53			valor p
	Global N= 60	Nula-Débil N= 38	Intensa N= 22	
SP Global Citoplasma				0,286
Nula-Débil	4 (6,7))	4 (10,5)	0 (0,0)	
Fuerte-Intensa	56 (93,3)	34 (89,5)	22 (100)	
SP Global Núcleo				0,038
Nula-Débil	24 (40,0)	19 (50,0)	5 (22,7)	
Fuerte-Intensa	36 (60,0)	19 (50,0)	17 (77,3)	
SP Global Estroma				0,97
Nula-Débil	38 (63,3)	24 (63,2)	14 (63,6)	
Fuerte-Intensa	22 (36,7)	14 (36,8)	8 (36,4)	
NK-1R Global Citoplasma				0,013
Nula-Débil	24 (40,0)	20 (52,6)	4 (18,2)	
Fuerte-Intensa	36 (60,0)	18 (47,4)	18 (81,8)	
NK-1R Global Núcleo				0,237
Nula-Débil	46 (76,7)	31 (81,6)	15 (68,2)	
Fuerte-Intensa	14 (23,3)	7 (18,4)	7 (31,8)	

2.14 Análisis de Correlaciones bivariadas

Se ejecutó un análisis bivariado mediante correlaciones de Spearman entre las variables cuantitativas cuyos resultados se exponen en la tabla 30. Se han descartado la edad y el PSA prequirúrgico debido a que no se obtuvieron correlaciones significativas entre ellas y el resto de las variables cuantitativas. Debido a que las distribuciones de las variables no eran simétricas, no se pudo aplicar el test de correlación de Pearson y se aplicó el test de correlación de Spearman. Como puede verse en la tabla por cada punto de expresión de la SP o NK-1R desciende la supervivencia libre de enfermedad, es decir, que disminuye el tiempo hasta la aparición de la recidiva bioquímica. En todos los

casos la correlación ha sido estadísticamente significativa excepto con la expresión de NK-1R en el citoplasma de las células tumorales (tabla 35).

Tabla 35. Correlaciones bivariadas (Spearman).

Correlación Spearman, Rho (valor p)	SLE	SP Cito	SP Nucl	SP Estr	NK-1R Cito	NK-1R Nucl
SLE	1					
SP Global Cito	-24,6 (0,058)	1				
SP Global Nucl	-37,2 (0,003)	35,3 (0,006)	1			
SP Global Estr	-49,4 (0,0005)	38,0 (0,003)	47,1 (0,0005)	1		
NK-1R Global Cito	-11,0 (0,404)	48,3 (0,0005)	37,9 (0,003)	31,5 (0,014)	1	
NK-1R Global Nucl	-51,7 (0,0005)	27,7 (0,032)	28,9 (0,025)	31,1 (0,015)	21,1 (0,106)	1

SLE: supervivencia libre de enfermedad (tiempo hasta recidiva bioquímica), SP Global Cito: puntuación global Allred de la expresión de la sustancia p en el citoplasma de las células tumorales; SP Global Nucl: puntuación global Allred de la expresión de la sustancia p en el núcleo de las células tumorales; SP Global Estr: puntuación global Allred de la expresión de la sustancia p en el citoplasma de las células estromales; NK-1R Global Cito: puntuación global Allred de la expresión de la NK-1R en el citoplasma de las células tumorales; NK-1R Global Nucl: puntuación global Allred de la expresión de la NK-1R en el núcleo de las células tumorales

El análisis de correlación de Spearman puso de manifiesto que a mayor expresión de SP/NK-1R menor supervivencia libre de enfermedad y que a medida que aumenta la expresión de SP aumenta la de NK-1R, siendo estas relaciones estadísticamente significativas. Sólo la correlación entre NK-1R en citoplasma y núcleo no alcanzó la significación estadística.

2.15 Análisis de supervivencia

La supervivencia mediana (RIC) fue de 111,1 (104,0 ; 113,6) meses tras la cirugía. Del total de los pacientes 2 (3,3%) presentaron recidiva bioquímica de la enfermedad en los primeros 12 meses la intervención, 8 (13,3%) en los primeros 5 años, y 24 (40,0%) en los primeros 10 años tras la cirugía.

Se hizo un análisis mediante curvas de Kaplan-Meier con el fin de describir la asociación entre algunas variables cualitativas y la supervivencia libre de enfermedad (SLE) a 10 años. Para comprobar si existían diferencias con significación estadística entre las distribuciones representadas se realizó el test de log Rank.

En la ilustración 24a, se aprecia la curva de Kaplan-Meier que compara la distribución de SLE a 10 en los pacientes con y sin afectación del margen radial. Siendo la supervivencia media del grupo que no presentaba afectación del margen radial superior (106,5; EE: 4,6; IC95%: 97,5-115,4) superior a la del grupo con infiltración de dicho borde quirúrgico (91,8; EE: 7,5; IC95%: 77,1-106,4); aunque no se demostró diferencias con significación estadística (log Rank: 3,1; gl=1; p=0,078).

En la ilustración 24b, se muestra el mismo análisis según que la puntuación de Gleason de la muestra fuera $\leq 6/\geq 7$. La supervivencia media del grupo con Gleason ≤ 6 (109,9 EE: 3,7; IC95%: 102,7-117,0) fue superior a la del grupo con Gleason ≥ 7 (86,3; EE: 8,4; IC95%: 69,9-102,7); siendo estas diferencias estadísticamente significativas (log Rank: 13,0; gl=1; p=0,0005).

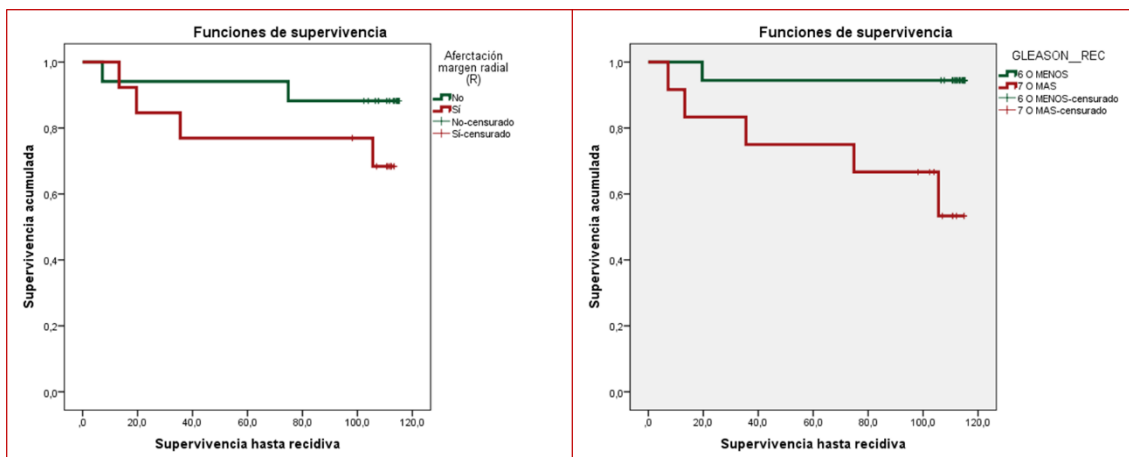


Ilustración 23. Curvas de Kaplan-Meier de SLE a 10 años. Curvas: a) afectación del margen radial (si/no). b) Puntuación de Gleason ($\leq 6/\geq 7$).

En la ilustración 25a, se aprecia la curva de Kaplan-Meier que compara la distribución de SLE a 10 en los pacientes con puntuación global (nula-débil [≤ 4]/intensa [>4]) en la escala de Allred de expresión de SP a nivel nuclear de las células tumorales. Siendo las diferencias estadísticamente significativas (log Rank: 9,7; gl=1; $p=0,002$).

En la ilustración 25b, se muestra el mismo análisis según puntuación global (nula-débil/intensa) en la escala de Allred de expresión de SP a nivel de las células estromales. Las diferencias fueron estadísticamente significativas (log Rank: 28,3; gl=1; $p=0,0005$).

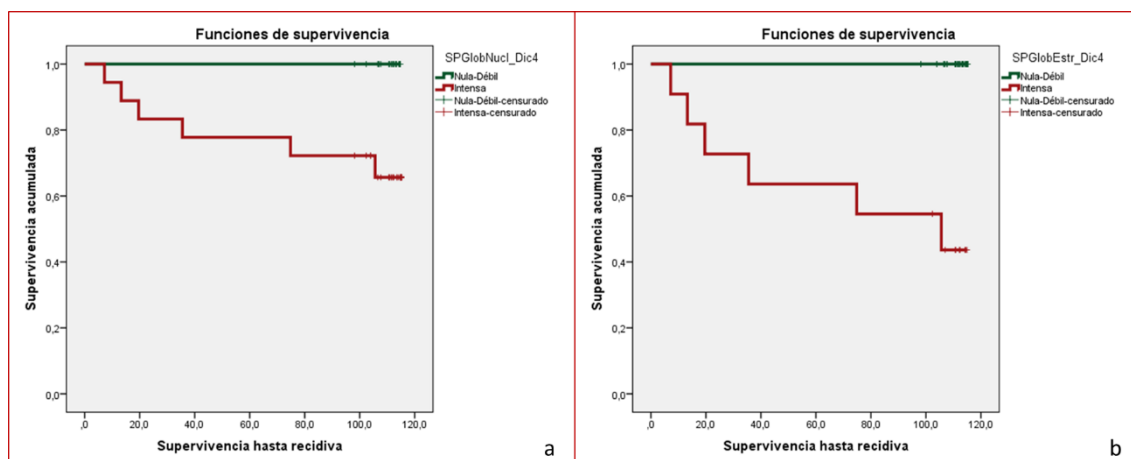


Ilustración 24. Curvas de Kaplan-Meier de SLE a 10 años en relación a la puntuación global (nula-débil/intensa) en la escala de Allred de expresión de SP. Curva a) a nivel nuclear de las células tumorales; y curva b) en las células estromales.

En la ilustración 26, se muestra la curva de Kaplan Meier según la puntuación global (nula-débil/intensa) en la escala de Allred de expresión de NK-1R a nivel nuclear de las células tumorales. La supervivencia media del grupo con expresión nula-débil (107,9 EE: 3,5; IC95%: 101,0-114,9) fue superior a la del grupo con expresión intensa (76,3; EE: 12,1; IC95%: 52,6-100,0); siendo estas diferencias estadísticamente significativas (log Rank: 12,7; $gl=1$; $p=0,0005$).

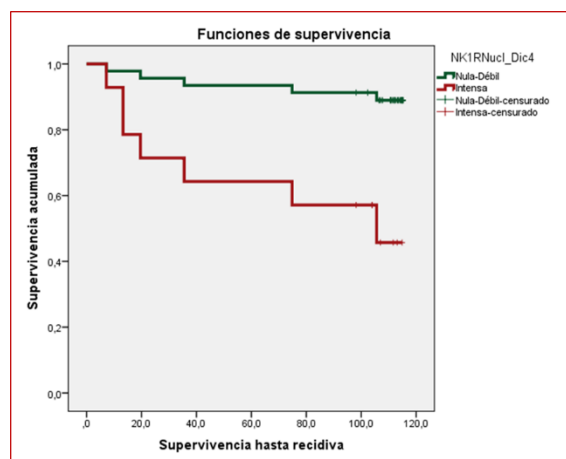


Ilustración 25. Curvas de Kaplan-Meier de SLE a 10 años en relación a la puntuación global (nula-débil/intensa) en la escala de Allred de expresión de NK-1R a nivel nuclear de las células tumorales

Se realizó un análisis bivariado entre la supervivencia libre de enfermedad (por rango temporal: supervivencia a 1 año, a 5 años y a 10 años) y las variables independientes. Los pacientes que desarrollaron recidiva bioquímica presentaron niveles más elevados de expresión de SP/NK-1R que los que tuvieron una evolución sin recidiva. Los valores medianos (RIC) de cada variable por grupo y tiempo de supervivencia y su correspondiente significación estadística, se reflejan en la tabla 36 e ilustración 20.

Tabla 36. Análisis bivalente entre la aparición o no de recidiva bioquímica y la expresión global de SP/NK-1R por grupo de supervivencia libre de enfermedad (SLE) a 1, 5 y 10 años.

Variable	SLE>1 año		SLE>5 años		SLE≥10 años	
	Mediana (P25 ; P75)	valor p	Mediana (P25 ; P75)	valor p	Mediana (P25 ; P75)	valor p
SP Global						
Citoplasma		0,041		0,071		0,122
Recidiva bioquímica	7,0 (6,0 ; 8,0)		6,0 (4,5 ; 6,5)		5,0 (4,0 ; 6,0)	
No recidiva bioquímica	5,0 (4,0 ; 6,0)		5,0 (4,0 ; 6,0)		5,0 (4,0 ; 5,0)	
SP Global Núcleo		0,014		0,0005		0,004
Recidiva bioquímica	7,0 (6,0 ; 8,0)		6,0 (5,0 ; 6,5)		4,5 (3,5 ; 6,0)	
No recidiva bioquímica	4,0 (3,0 ; 4,0)		4,0 (3,0 ; 4,0)		3,5 (3,0 ; 4,0)	
SP Global Estroma		0,018		0,0005		0,002
Recidiva bioquímica	6,0 (5,0 ; 7,0)		5,0 (4,0 ; 6,5)		4,0 (3,0 ; 5,0)	
No recidiva bioquímica	3,0 (3,0 ; 4,0)		3,0 (3,0 ; 4,0)		3,0 (3,0 ; 3,0)	
SP NK1-R						
Citoplasma		0,793		0,265		0,769
Recidiva bioquímica	5,0 (4,0 ; 6,0)		5,0 (3,5 ; 7,0)		5,0 (3,0 ; 6,0)	
No recidiva bioquímica	4,0 (3,0 ; 6,0)		4,0 (3,0 ; 6,0)		4,0 (3,0 ; 6,0)	
SP NK1-R Núcleo		0,598		0,002		0,0005
Recidiva bioquímica	2,5 (0,0 ; 5,0)		4,5 (1,5 ; 5,0)		3,0 (0,0 ; 5,0)	
No recidiva bioquímica	0,0 (0,0 ; 3,0)		0,0 (0,0 ; 0,0)		0,0 (0,0 ; 0,0)	

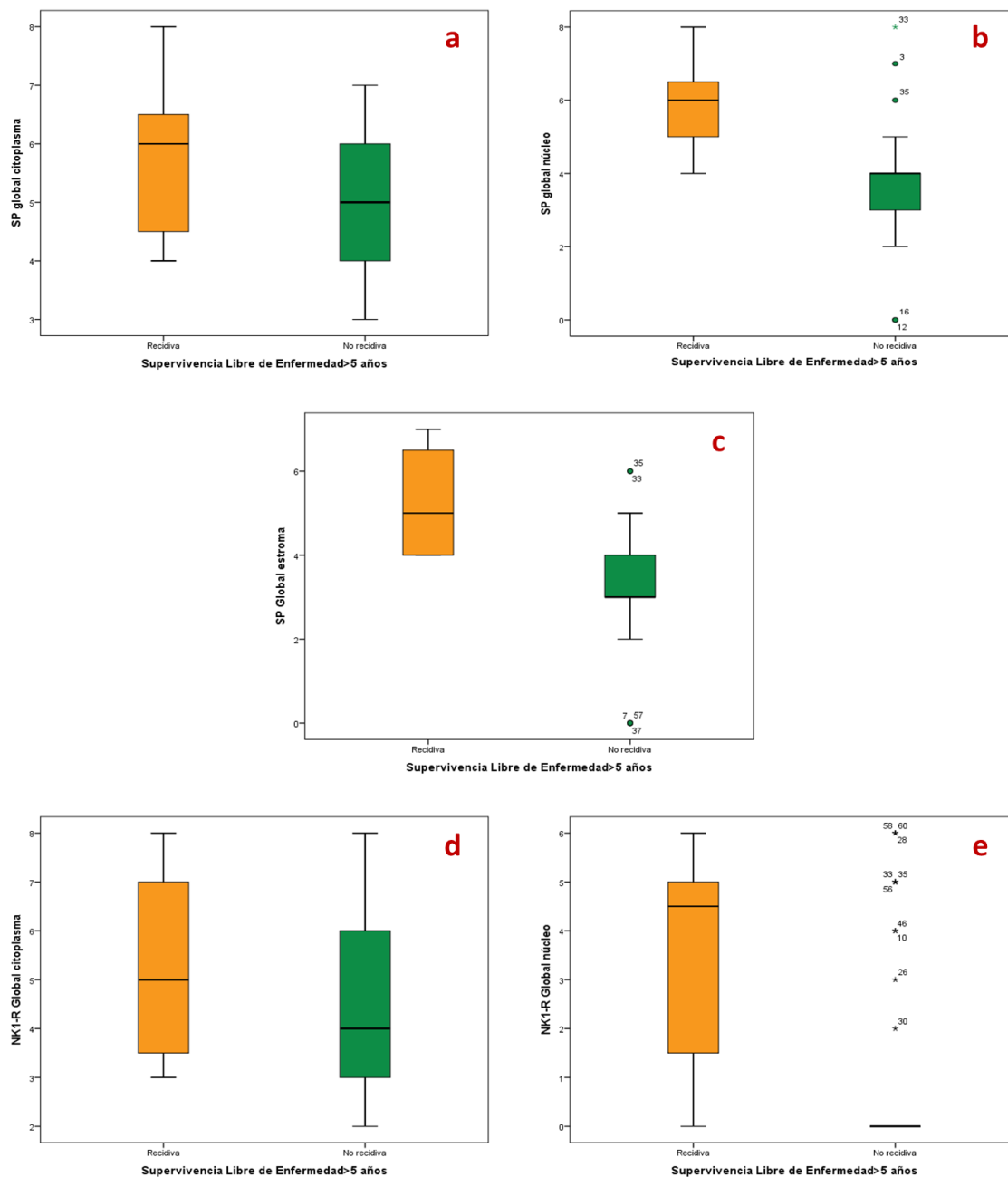


Ilustración 26. Distribución de la expresión de $\underline{S}P/NK-1R$ (puntuación Allred) según estado de supervivencia libre de enfermedad (Con recidiva bioquímica/ Sin recidiva bioquímica) a los 5 años de seguimiento: a) $\underline{S}P$ global a nivel del citoplasma de la célula tumoral; b) $\underline{S}P$ global a nivel del núcleo de la célula tumoral; c) $\underline{S}P$ global a nivel del citoplasma del estroma; d) $NK-1R$ global a nivel del citoplasma de la célula tumoral; e) $NK-1R$ global a nivel del núcleo de la célula tumoral.

En la tabla 37 se expresa el análisis bivariado entre la SLE y las posibles variables explicativas.

Tabla 37. Análisis bivariado de supervivencia.

Variable	SLE>5 años			SLE≥10 años		
	Recidiva	No Recidiva	Valor p	Recidiva	No Recidiva	Valor p
	N= 8	N= 52		N= 24	N= 36	
Edad al diagn. (años), Med (RIC)	59,1 (56,6 ; 64,2)	65,2 (58,1 ; 68,7)	0,22	64,5 (56,6 ; 67,3)	65,0 (58,1 ; 68,7)	0,717
PSA prequirúrgico, Med (RIC)	6,9 (6,4 ; 8,2)	6,4 (4,2 ; 7,2)	0,074	6,4 (4,2 ; 8,9)	6,4 (6,0 ; 6,8)	0,883
SP Global Citoplasma, Med (RIC)	6,0 (4,5 ; 6,5)	5,0 (4,0 ; 6,0)	0,071	5,0 (4,0 ; 6,0)	5,0 (4,0 ; 5,0)	0,122
SP Global Núcleo, Med (RIC)	6,0 (5,0 ; 6,5)	4,0 (3,0 ; 4,0)	0,0005	4,5 (3,5 ; 6,0)	3,5 (3,0 ; 4,0)	0,004
SP Global Estroma, Med (RIC)	6,0 (4,0 ; 6,5)	3,0 (3,0 ; 4,0)	0,0005	4,0 (3,0 ; 5,0)	3,0 (3,0 ; 3,0)	0,002
NK1-R Citoplasma, Med (RIC)	5,0 (3,5 ; 7,0)	4,0 (3,0 ; 6,0)	0,265	5,0 (3,0 ; 6,0)	4,0 (3,0 ; 6,0)	0,769
NK1-R Núcleo, Med (RIC)	4,5 (1,5 ; 5,0)	0,0 (0,0 ; 0,0)	0,002	3,0 (0,0 ; 5,0)	0,0 (0,0 ; 0,0)	0,005
Radioterapia, N (%)			0,021			0,01
No	4 (50,0)	46 (88,5)		16 (66,7)	34 (94,4)	
Sí	4 (50,0)	6 (11,5)		8 (33,3)	2 (5,6)	
Puntuación de Gleason, N (%)			0,05			0,0005
Gleason≤6	2 (25,0)	34 (65,4)		6 (25,0)	30 (83,3)	
Gleason≥7	6 (75,0)	18 (34,6)		18 (75,0)	6 (16,7)	
Tamaño del tumor (pT), N (%)			0,288			0,05
pT2	6 (75,0)	46 (88,5)		18 (75,0)	34 (94,4)	
pT3a	2 (25,0)	6 (11,5)		6 (25,0)	2 (5,6)	
Infiltración margen radial, N (%)			0,067			0,395
No	2 (25,0)	32 (61,5)		12 (50,0)	22 (61,1)	
Sí	6 (75,0)	20 (38,5)		12 (50,0)	14 (38,9)	
Infiltración del ápex, N (%)			0,33			0,157
No	8 (100)	42 (80,8)		22 (91,7)	28 (77,8)	
Sí	0 (0)	10 (19,2)		2 (8,3)	8 (22,2)	
Expresión IHQ de Bcl2, N (%)			0,138			
No	7 (85,7)	30 (57,7)		16 (66,7)	21 (58,3)	
Sí	1 (22,5)	22 (42,3)		8 (33,3)	15 (41,7)ç	
Expresión IHQ de p53, N (%)			0,892			0,775
Negativa	5 (62,5)	33 (63,5)		14 (58,3)	24 (66,7)	
Débil	2 (25,0)	15 (28,8)		8 (33,3)	9 (25,0)	
Intermedia	1 (12,5)	4 (7,7)		2 (8,3)	3 (8,3)	

Edad al diagn: edad al diagnóstico medida en años, IHQ: inmunohistoquímica, Med: mediana, RIC: recorrido intercuartílico expresado por (percentil 25; percentil 75)

Del análisis bivariado de supervivencia a 5 y 10 años frente al resto de las variables expresado en la tabla 32, se eligieron las variables cuyo valor de p de Pearson fue inferior a 0,15 (excepto las variables que medían la expresión de SP y NK-1R que aun siendo p igual o mayor a este valor se incluyeron en los modelos multivariantes).

En la tabla 38, se muestran los modelos univariantes de supervivencia a 5 años. En ella se expresa la razón de riesgo, *hazard ratio* (HR), su intervalo de confianza y la significación estadística. Se aprecia que por cada punto de más en la escala de Allred de la expresión de SP en el estroma y de NK-1R en el núcleo se incrementa el riesgo de recurrencia en 1,4 y 1,2, respectivamente. Cuando existe infiltración del margen radial se incrementa el riesgo de recurrencia en 2,5 veces. En esta muestra tener un Gleason superior o igual a 7 aumenta el riesgo de recurrencia en 2,4 veces (tabla 38).

Tabla 38. Modelos univariantes de riesgos proporcionales de Cox (cada variable constituye un modelo por separado) (supervivencia a 5 años).

Supervivencia a 5 años			
Modelos univariantes	HR	IC 95%	valor p
SP global estroma	1,359	0,991 ; 1,862	0,057
NK-1R global núcleo	1,208	1,027 ; 1,420	0,022
Gleason ($\leq 6/\geq 7$)	2,378	1,295 ; 4,368	0,005
Infiltración del margen radial	2,456	1,222 , 4,939	0,012

Se obtuvieron dos modelos bivariantes significativos, modelos 2 y 3 de la tabla 39.

Tabla 39. Modelos bivariantes de riesgos proporcionales de Cox (supervivencia a 5 años).

Supervivencia a 5 años			
Modelo bivariante 1	HR	IC 95%	valor p
NK-1R global núcleo	1,121	0,941 ; 1,337	0,202
Gleason ($\leq 6/\geq 7$)	2,092	1,018 ; 4,301	0,045
Modelo bivariante 2			
NK-1R global núcleo	1,264	1,066 ; 1,498	0,007
Infiltración del margen radial	2,837	1,386 ; 5,809	0,004
Modelo bivariante 3			
Infiltración del margen radial	2,17	1,059 ; 4,445	0,034
Gleason ($\leq 6/\geq 7$)	2,197	1,130 ; 4,273	0,02

Controlando por la puntuación de Gleason ($\leq 6/\geq 7$), y por la puntuación global en la expresión de NK-1R; la presencia de afectación del margen radial incrementa el riesgo de recidiva a los 5 años de evolución postquirúrgica en 2,5 veces (tabla 40).

Tabla 40. Modelo multivariante de riesgos proporcionales de Cox (supervivencia a 5 años).

Supervivencia a 5 años			
Modelo multivariante	HR	IC 95%	valor p
Gleason ($\leq 6/\geq 7$)	1,666	0,787 ; 3,525	0,182
Infiltración del margen radial	2,539	1,212 ; 5,316	0,013
NK-1R global núcleo	1,191	0,987 ; 1,438	0,069

Como los pacientes se han seguido durante 10 años, decidimos analizar la supervivencia a los 10 años desde la intervención quirúrgica. En las tablas 41-43 se expresan los modelos riesgos proporcionales de Cox univariante, bivariante y multivariante, respectivamente.

Tabla 41. Modelo univariante de riesgos proporcionales de Cox (cada variable constituye un modelo por separado) (supervivencia a 10 años).

Supervivencia a 10 años			
Modelo univariante	HR	IC 95%	valor p
SP global estroma	1,566	1,048 ; 2,340	0,029
Tumor (pT)	16,492	2,323 ; 117,107	0,005
Infiltración del margen radial	3,959	1538 ; 10,192	0,004
Infiltración del ápex	7,015	2,575 ; 19,110	0,0005
Edad (años)	0,930	0,889 ; 0,972	0,001
PSA prequirúrgico	0,832	0,704 ; 0,983	0,031

Tabla 42. Modelos bivariantes de riesgos proporcionales de Cox (supervivencia a 10 años).

Supervivencia a 10 años			
Modelo bivalente 1	HR	IC 95%	valor p
Infiltración del margen radial	9,582	3,188 ; 28,799	0,0005
Edad (años)	0,906	0,857 ; 0,958	0,0005
Modelo bivalente 2			
Infiltración del margen radial	6,982	2,507 ; 19,442	0,0005
Infiltración del ápex	3,781	1,425 ; 10,033	0,008
Modelo bivalente 3			
Infiltración del margen radial	6,447	12,314 ; 17,963	0,0005
Tumor (pT)	7,628	1,062 ; 54,818	0,043
Modelo bivalente 4			
Infiltración del margen radial	6,369	12,314 ; 17,963	0,0005
SP global estroma	1,479	0,982 ; 2,228	0,061
Modelo bivalente 5			
Infiltración del margen radial	6,239	2,290 ; 17,000	0,0005
PSA prequirúrgico	0,848	0,702 ; 1,025	0,088

Tabla 43. Modelos multivariantes de riesgos proporcionales de Cox (supervivencia a 10 años).

Supervivencia a 10 años			
Modelo multivariante 1	HR	IC 95%	valor p
Infiltración del margen radial	10,062	3,252 ; 31,134	0,0005
Edad (años)	0,92	0,866 ; 0,977	0,007
PSA prequirúrgico	0,73	0,569 ; 0,937	0,013
Modelo multivariante 2			
Infiltración del margen radial	6,389	2,270 ; 17,985	0,0005
Infiltración del ápex	3,971	1,494 ; 10,556	0,006
SP global estroma	1,547	0,995 ; 2,406	0,053
Modelo multivariante 3			
Infiltración del margen radial	7,307	2,615 ; 20,420	0,0005
Infiltración del ápex	3,843	1,434 ; 10,298	0,007
PSA prequirúrgico	0,849	0,706 ; 1,020	0,081
Modelo multivariante 4			
Infiltración del margen radial	6,824	2,371 ; 19,643	0,0005
Infiltración del ápex	4,354	1,584 ; 11,965	0,004
SP global estroma	1,74	1,138 ; 2,663	0,011
PSA prequirúrgico	0,786	0,647 ; 0,953	0,014

El modelo multivariante de riesgos proporcionales de Cox de supervivencia a 10 años demostró que la infiltración del margen radial, la infiltración tumoral del ápex, la expresión de SP a nivel de las células estromales y la concentración plasmática (ng/ml) de PSA prequirúrgica incrementan el riesgo de recurrencia bioquímica y por tanto disminuyen la SLE a 10 años de manera significativa (tabla 43, modelo multivariante 4).

Discusión

4 DISCUSIÓN

2.16 Limitaciones y sesgos

Debido a las limitaciones asociadas a la sostenibilidad del proyecto del proyecto, se tomó la decisión de realizar el estudio inmunohistoquímico mediante la realización de microarrays (TMA) en vez de sobre cortes tisulares completos. Esto ha podido llevarnos a un sesgo de selección ya que la heterogeneidad teórica del tejido tumoral puede estar infrarrepresentada. Igualmente, el estroma subyacente con algunas de las características del tejido prostático puede haberse visto limitada al no disponer de una sección completa del bloque.

Para minimizar estos sesgos se hizo una revisión histológica de todas las secciones representativas de cada una de las piezas estudiadas seleccionándose para los estudios de *arrays* un área con adecuado volumen tumoral, alejada del margen radial circunferencial para evitar artefactos quirúrgicos y de procesamiento. Además se prestó especial interés en que las áreas de tejido tumoral y no tumoral estuvieran suficientemente representadas. Esta revisión permitió la comprobación de los diagnósticos emitidos con anterioridad.

Con el fin de homogeneizar la variabilidad asociada a la técnica quirúrgica, se seleccionaron aquellos casos realizados mediante la misma técnica (prostatectomía vía laparoscópica) rechazándose las prostatectomías vía abierta. Además, se seleccionaron los casos intervenidos por el mismo cirujano principal y ayudante, evitando la heterogeneidad de los resultados asociados a la variabilidad quirúrgica.

Todas las piezas quirúrgicas fueron talladas macroscópicamente por los tres mismos patólogos que siguieron el protocolo normalizado de trabajo siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Española de Anatomía patológica (SEAP).

El procesamiento de las muestras previo a la tinción de rutina con H-E (H/E) se realizó de manera automatizada mediante el instrumento Excelsior AS[®], asegurándonos así de reducir los sesgos asociados a variabilidad durante el procesamiento de fijación e inclusión en parafina. Los cortes de los bloques de parafina fueron realizados por el mismo técnico usando el mismo micrótopo (Micron[®], Leica) con un espesor de 5 micras. Una vez finalizada esta fase y realizado el montaje con DPX y correcto etiquetado, los patólogos (patólogos 1 y 2) que han ayudado a la realización de este estudio, revisaron los diagnósticos histológicos, seleccionaron, mediante consenso, los mejores cortes, y dentro de ellos las áreas de interés para construir los microarrays de tejido (TMA), usando un microscopio óptico Olympus[®] CX31.

Una vez contruidos los microarrays con los cilindros seleccionados de tejido normal y tumoral se inició la siguiente fase: la tinción inmunohistoquímica. Previamente al procesamiento de tinción con anticuerpos, se hizo un control con H-E para comprobar la calidad de las muestras tisulares.

El procesamiento de la técnica inmunohistoquímica que se realizó asimismo de forma automatizada mediante el instrumento Benchmark XT[®] que es un sistema totalmente automatizado, por lo que se reducen los sesgos debido a la variabilidad en el proceso de inmunotinción.

Para cada técnica inmunohistoquímica realizada se han llevado a cabo los correspondientes controles de calidad (preabsorción, control negativo y control positivo) con el fin de demostrar la fiabilidad y reproducibilidad de la técnica empleada. Lo que se ha podido constatar mediante la observación de todos los casos, valorando que el patrón de inmunorreactividad tanto de la SP como del NK-1R se circunscribiese y coincidiese con las estructuras anatómicas e histológicas descritas para estas técnicas en estudios previos. Todo esto permite afirmar que los resultados de la expresión inmunohistoquímica reflejan la existencia real en dichos tejidos tanto de la SP como del NK-1R. A su vez, el empleo de una escala semicuantitativa, sistema *Allred Unit Scoring*, para la valoración de la extensión e intensidad de la inmunorreactividad permitió homogeneizar y objetivar en mayor medida los resultados obtenidos entre los diferentes casos de estudio.

La evaluación de la expresión inmunohistoquímica se realizó mediante la revisión por pares cegada. En caso de discordancia fueron los directores de la tesis Dr. Muñoz y Dr. Segura expertos mundial y nacional, respectivamente, en la materia quienes resolvieron la disensión.

La demostración de la expresión tanto de la SP como del NK-1R en el CPr humano orienta a hacia su papel en la fisiopatología del cáncer y nos muestra una posible vía de abordaje terapéutico basado en el bloqueo mediante antagonistas específicos del NK-1R.

2.17 Resultados principales del estudio inmunohistoquímico de la expresión de la SP y NK-1R en el adenocarcinoma de próstata

Por primera vez, se ha puesto de manifiesto la expresión de la SP/NK-1R en el CPr humano, siendo superior en el tejido tumoral que en el normal. Además se ha demostrado la asociación entre la expresión de SP/NK-1R con la supervivencia libre de enfermedad a 1, 5 y 10 años y por tanto con la aparición de recidivas bioquímicas.

Se ha demostrado por primera vez que la expresión de SP/NK-1R es mayor en el tejido tumoral que en el tejido normal; que los tumores con una puntuación de Gleason ≥ 7 expresan más SP/NK-1R, especialmente a nivel nuclear de las células tumorales y en las células estromales; que los tumores que desarrollaron una recidiva bioquímica antes de los 5 o 10 años de evolución postquirúrgica presentaban mayor expresión de SP/NK-1R en la pieza de prostatectomía; y que la expresión de Bcl2 y p53 se asocian a niveles más altos de expresión de SP a nivel nuclear y de NK-1R a nivel del citoplasma, pero no se ha podido demostrar la asociación de Bcl2 y p53 con la SLE.

También se ha puesto de manifiesto por primera vez que a mayor expresión de SP a nivel nuclear de las células tumorales y estromales menor SLE; lo que también se ha demostrado cuando la expresión de NK-1R aumenta a nivel nuclear en las células neoplásicas del CPr.

Otros factores que influyen en la reducción de la SLE son:

- el componente pT de la clasificación pTNM, de manera que los tumores pT3 recidivan con más frecuencia a los 5 y 10 años de seguimiento que los pT2.
- La puntuación de Gleason, de forma que los CPr con Gleason \geq 7 tienen una menor SLE a 5 y 10 años que los que tienen puntuación Gleason \leq 6.
- La afectación del margen radial circunferencial en la pieza de prostatectomía radical disminuye la SLE a los 5 y 10 años.
- La infiltración del ápex en la pieza quirúrgica sólo se asocia a una reducción de SLE a los 10 años.

El estudio inmunohistoquímico de SP sobre tejido sano indica que prácticamente la totalidad de las muestras (95%) expresaban SP, pero en menor intensidad que en las células del epitelio tumoral, lo que concuerda con los hallazgos de otros autores (299). Es importante recalcar que la localización predominante fueron las células del epitelio glandular. El hecho de que a nivel de las células estromales la tinción de SP fuera muy elevada (95%), puede estar en relación con el papel de intercomunicación (*cross-talk*)/co-inducción entre las células tumorales y del estroma peritumoral. SP puede estar desempeñando, mediante un efecto paracrino, el papel de mensajero intercelular a través de su receptor específico NK-1R estimulando la mitogénesis, la angiogénesis, modificando la matriz extracelular, atrayendo células inflamatorias y promoviendo la migración celular.

Es ampliamente conocido que la SP mediante su receptor NK-1R actúa como un mitógeno universal tanto a nivel del tejido normal (p.e.: corazón, placenta) como del tumoral (p.e.: en el neuroblastoma, glioma, retinoblastoma,

melanoma, cáncer de laringe, pulmón y mama, osteosarcoma, hepatoblastoma y en los adenocarcinomas de estómago, páncreas y colon) (3,174). Sin embargo, Berger et al. no encontraron expresión de SP a nivel del núcleo de las células del hepatoblastoma probablemente debido al hecho de que se trata de una tumor de origen embrionario (303).

A nivel intracelular la distribución de la SP era predominantemente citoplasmática aunque también podía observarse en la membrana y en el núcleo, así como combinaciones de los tres. Estos resultados están en consonancia con los datos obtenidos en el tejido sano. La tinción de SP se distribuye por las áreas con mayor densidad de mitosis, tanto en tejido sano como en tejido tumoral. Todos estos resultados parecen indicar que la SP, además de otras muchas funciones biológicas, tiene la capacidad de inducir la replicación celular en los tejidos donde se expresa. La presencia de SP en el citoplasma y núcleos de las células epiteliales del CPr está en consonancia con las observaciones previas de otros autores en distintos tumores humanos (249,299,303,319–322). En este sentido la presencia de SP en el núcleo de las células del CPr está de acuerdo con los estudios previos en los que este neurotransmisor fue observado en los núcleos de las siguientes células tumorales: carcinoma escamoso de la cavidad oral (319), cáncer de laringe (249), cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas (308), en el cáncer de mama (309), en el cáncer pancreático (322) y en el cáncer gástrico (299).

En la muestra estudiada, se ha encontrado una asociación con significación estadística entre la expresión de la SP a nivel nuclear y la expresión IHQ de p53; así como de NK-1R a nivel citoplásmico y la expresión de este gen

supresor. Esto puede indicar que estas células tienen capacidad de replicación celular ilimitada y autónoma por pérdida de la función de los genes reguladores de la muerte celular programada y la progresión del ciclo celular y de la aparición de la mutación cMyc (6,310,323,324). La presencia de SP/NK-1R en esas mismas células indica que además tienen un aumento de la proliferación debido al efecto mitogénico de la SP, demostrando con ello, que el péptido estudiado y su receptor NK-1R ejerce un papel importante en el desarrollo del CPr.

En este estudio se ha demostrado que la expresión de SP en las células estromales es superior en el tejido tumoral que en el normal, aumenta el riesgo recidiva bioquímica y disminuye al SLE a 5 y 10 años. Esto puede estar relacionado con la inducción estromal de la progresión de la neoplasia prostática en el frente de avance tumoral (transición epitelio-mesenquimal). La intercomunicación entre estroma y tumor ya ha sido expresado en estudios previos y es un área de interés actual (90,325,326).

La expresión de SP y NK-1R (ambos a nivel nuclear) es superior en los tumores que presentaron recidiva bioquímica, por lo que se ha demostrado una disminución la SLE a los 5 y 10 años. Esto se puede relacionar con el papel promotor que el binomio SP/NK-1R desempeña en la proliferación, adhesión, migración e invasión de las células neoplásicas prostáticas y de otras localizaciones (327). La migración de las células tumorales para invadir y metastatizar es un prerrequisito para la progresión tumoral y por esta razón la formación de vesículas de membrana es muy importante (174,328).

Debido a que la mama es un órgano glandular que comparte aspectos histológicos, inmunohistoquímicos, receptores hormonales y marcadores

moleculares con la próstata, hemos decidido extrapolar los resultados de estudios con SP/NK-1R en el cáncer de mama (CMA) ya que no existen antecedentes de estudios sobre la expresión de SP/NK-1R en CPr. La expresión de SP/NK-1R en el CMA se asocia con invasión y metástasis (329). Lo que coincide con los resultados de nuestro estudio. Zhou et al, demostraron que tanto la forma completa como la truncada del receptor NK-1R estaban asociadas a la progresión y las metástasis. Aunque postulan que la forma truncada de este receptor puede promover la progresión tumoral hacia un fenotipo más agresivo a través de un mecanismo molecular aún desconocido (329).

Algunos estudio han concluido que la densidad de receptores de membrana NK-1R es relevante en la proliferación celular. Si extrapolamos estos estudios a nuestra muestra, en la que comprobamos que los CPr con mayor puntuación de Gleason muestran mayor expresión de NK-1R, factor relevante en la proliferación celular; así podríamos inferir que a mayor Gleason mayor proliferación celular. Por lo tanto, es de suponer que el uso de antagonistas de NK-1R como el Aprepitant podía ser un arma terapéutica para los CPr con puntuación de Gleason alta.

En los casos estudiados la invasión perineural se asociaba a una menor supervivencia. Una de las características de las células malignas es su capacidad para disociarse del tumor primario y establecer depósitos metastásicos a distancia. Los vasos sanguíneos y linfáticos son rutas bien aceptadas de diseminación. La invasión perineural otra vía de diseminación tumoral y se asocia con un mal pronóstico en diversas neoplasias malignas incluidas en CCR, cáncer pancreático, de próstata, cabeza y cuello, tracto biliar

y estómago (330–334). La invasión perineural se ha asociado en muchas series de casos como un fenómeno prevalente en el CCR llegando a aparecer hasta en el 33 % de los casos en el momento de la resección. Diversos estudios han puesto de manifiesto una correlación estadísticamente significativa entre la invasión perineural en el CCR y un aumento en las tasas de recurrencia, supervivencia a los 5 años, así como un aumento de la probabilidad de encontrar enfermedad metastásica en el momento de la extirpación. Además, este estudio ha permitido demostrar que la expresión de SP a nivel nuclear se relaciona de manera estadísticamente significativa con la invasión perineural, resultados que concuerdan con los obtenidos por primera vez por Li et al. en 2013 (7), quienes afirman que la SP es un mediador de la interacción entre las células tumorales y el sistema nervioso, y promueve la proliferación, invasión y neurotropismo del cáncer de páncreas. Luego la SP parece promover la invasión perineural en el cáncer. Por tanto, el tratamiento con antagonistas SP/NK-1R se puede convertir en una estrategia terapéutica para evitar la diseminación vía perineural del CCR.

Dos variantes naturales del NK1-R, el receptor 407 aa de longitud completa (NK-1R-F) que es el objeto del presente estudio y la isoforma 311 aa denominada troncada (NK-1R-T) median las acciones de SP. El truncamiento del receptor altera parcialmente los motivos de señalización de la cola de carboxilo, un sitio crítico para mediar la señalización de NK1-R, dando como resultado un receptor "menos eficiente". Aunque NK-1R-F es la isoforma predominante en los sistemas nerviosos central y periférico, NK-1R-T se expresa en varios tejidos y células, que incluyen monocitos, células NK y células T. El dominio de unión SP no se ve afectado por el truncamiento y este sitio es idéntico

en ambas isoformas del receptor NK1-R. Sin embargo, mientras que las células que expresan NK-1R-F responden a concentraciones nanomolares de SP, la activación de monocitos y macrófagos, mediada por NK-1R-T, requiere concentraciones micromolares de SP para provocar respuestas de señalización. Los niveles elevados de SP en plasma se asocian con un aumento de las respuestas inflamatorias y los antagonistas de NK1-R reducen la inflamación y la producción de citoquinas in vivo(335).

La administración de antagonistas no peptídicos NK-1R (L-733,060) y aprepitant han demostrado actividad antitumoral en líneas celulares de tumores gastrointestinales, neuroblastomas, gliomas, melanoma y cáncer de páncreas (296,297,304,336). La migración de las células tumorales de la línea MDA-MB-468 de cáncer de mama y de las células IPC-3 de CPr inducidas por la SP podrían ser inhibidas usando el antagonista L-733,060 (337).

Existen evidencias que sugieren que el receptor NK-1R (forma truncada) puede ser una prometedora diana terapéutica para el tratamiento del cáncer incluyendo el cáncer de mama (329) y por extrapolación del CPr. Estos datos demuestran el patrón diferencial de expresión de NK-1R en el CPr. Los datos de los estudios in vitro sugieren que las dos formas del NK-1R pueden ejercer funciones opuestas en la regulación de muchos aspectos celulares de la génesis tumoral, incluyendo la proliferación, adhesión, infiltración, migración y metástasis. Son necesarios estudio futuros para determinar los mecanismos moleculares diferenciales entre las dos formas del receptor NK-1R en el CPr.

El papel modulador de SP/ NK-1R de las funciones de las células del sistema inmune parece estar implicado en la atracción de células inmunes hacia el estroma tumoral que van a actuar como promotores de la progresión tumoral.

Recientemente, se ha documentado un importante papel del componente hereditario en el CPr. Así, se ha expresado que diferentes variantes alélicas de distintos genes incluidos en distintas vías inflamatorias pueden ser considerados factores de riesgo del CPr hereditario (338).

En las áreas de inflamación crónica de la próstata que son lugares frecuentes de desarrollo del CPr (113), se produce una transición de atrofia inflamatoria a neoplasia intraepitelial prostática de alto grado en la que abundan los macrófagos asociados a los tumores (TAM) . Los TAM suprimen la actividad antitumoral del sistema inmunitario, incrementando la diseminación de las células tumorales potenciando las metástasis y estimulando la neoangiogénesis (339). La expresión de SP/NK-1R también se ha demostrado en los macrófagos placentarios (células de Hofbauer) (232).

Se conoce que SP se expresa a nivel citoplásmico en los macrófagos tanto en lesiones agudas como crónicas. Por el contrario, los neutrófilos de algunas lesiones agudas han mostrado su negatividad para el citado undecapéptido, aunque se ha demostrado que SP se comporta como un promotor de la migración de los neutrófilos hacia el foco inflamatorio (340,341). También se ha señalado que SP se asocia a la elevación de la expresión intracelular de moléculas de adhesión de tipo 1 intracelulares así como moléculas de adhesión vascular de tipo 1 en las células endoteliales. Las células endoteliales que se encuentran con un antígenos comienzan a expresar SP e

incrementan la permeabilidad vascular y la expresión de moléculas de adhesión (342–344).

Aunque las terapias selectivas que bloquean la ruta PD-1/PDL-1 han mostrado prometedores resultados en varios tipos de cánceres, en especial tumores sólidos, el efecto de estas terapias en el CPr es ambiguo, lo que puede deberse al fenotipo de los linfocitos hallados en los CPr que pueden ser refractarios a la estimulación (345). Otra posible explicación puede deberse a la baja expresión de PDL-1 en las células de CPr, aunque el valor de esta conclusión queda limitado por el escaso tamaño muestral de los estudios realizados. Por ello, se deberían llevar a cabo estudio de cohortes con muestra suficiente para determinar la eficacia de esta línea de tratamiento (346).

La angiogénesis es fundamental para el crecimiento de la masa tumoral. El proceso de neoangiogénesis es una característica esencial del desarrollo tumoral y se ha asociado con un aumento de la invasión y de la expresión de los receptores NK-1R (347). Se trata de un proceso secuencial con proliferación de células endoteliales que incrementan el flujo sanguíneo. Posteriormente, se produce un proceso de maduración de la regulación del sistema neurovascular en los tejidos inflamados, todo ello mediado por SP (301). En nuestro estudio se ha demostrado la expresión de SP/NK-1R a nivel del citoplasma celular de las células endoteliales los que coincide con otros estudios que demuestran la expresión a nivel citoplásmico SP en algunos tejidos inflamatorios y de granulación (173,245). La neoangiogénesis se asocia a un incremento en la invasión y en la expresión de los receptores NK-1R. Los terminales periféricos nerviosos que expresan este neuropéptido están implicados en el crecimiento de

los vasos capilares, como se ha podido demostrar in vivo y en células capilares cultivadas in vitro (301). La proliferación de células endoteliales se incrementa de manera dependiente a la concentración de agonistas de NK-1R, mientras que los antagonistas del NK-1R bloquean la acción proliferativa de SP. Por otro lado, la acción selectiva de los agonistas de los receptores NK-2R y NK-3R no tienen efecto significativo en la proliferación de las células endoteliales (263,301). Por lo tanto, mediante estos receptores, presentes a altas densidades en los vasos sanguíneos, SP puede influir fuertemente en la estructura vascular y funcionar tanto dentro como alrededor del tumor, aumentando el flujo sanguíneo hacia el tumor y fomentando el desarrollo del estroma (245).

Otro mecanismo por el cual las células inflamatorias regulan la angiogénesis y consecuentemente la tumorigénesis, es la producción de mediadores proangiogénicos como el VEGF-a (348). Además células supresoras del sistema inmune de tipo mieloide (Gr+CD11b+) pueden diferenciarse a células endoteliales y directamente incorporarse al endotelio tumoral en animales portadores de tumores (349). Otros mediadores solubles derivados de células inflamatorias, conocidos como moduladores del desarrollo del cáncer, son las proteasas de serina y cisteína, los agentes perforantes de membrana, TNF- α , interleucinas e interferones (350). La acción conjunta de estos mediadores solubles derivados del huésped, activa la respuesta inmune innata, promoviendo el reclutamiento celular, la remodelación tisular y la angiogénesis creando un microambiente que favorece la proliferación celular, la inestabilidad genómica, y la expansión de ciertas poblaciones celulares hacia microambientes situados en tejidos ectópicos, con los que se alcanzaría, finalmente, la transformación maligna y desarrollo del cáncer (350).

El CPr es uno de los tumores en los que más frecuentemente aparece la IPN. En nuestro estudio, la IPN se demostró en algunos de las muestras estudiadas, como se documenta en la figura 18b. En los casos estudiados la IPN se asociaba a una menor supervivencia. Una de las características de las células malignas es su capacidad para disociarse del tumor primario y establecer depósitos metastásicos a distancia. Los vasos sanguíneos y linfáticos son rutas bien aceptadas de diseminación en casi todos los tumores, pero la IPN es otra vía de diseminación tumoral, que se asocia con un mal pronóstico en diversas neoplasias malignas como el CCR, el de páncreas, el CPr, el de cabeza y cuello, de tracto biliar y el de estómago (330–333). La IPN se ha asociado en muchas series de casos como un fenómeno prevalente en el CPr en las piezas de prostatectomía radical. Diversos estudios han puesto de manifiesto una correlación estadísticamente significativa entre la IPN en el CPr y un aumento en las tasas de recurrencia a los 5 años.

La presencia de IPN en la biopsia de CPr, definida por carcinoma diseminado a lo largo o alrededor de un nervio dentro del espacio perineural, se ha encontrado en 15% a 62% de las muestras de CPr (351). La IPN se ha identificado como un factor de riesgo adicional e independiente junto a la puntuación de Gleason, el estadio clínico y los niveles de PSA en el CPr (366–385). Algunos estudios, sin embargo, han cuestionado el valor pronóstico general de la IPN (39–41,49–51,103,158,198,386,387). Por ello, la IPN no se considera de manera universal como un factor pronóstico estándar para orientar el tratamiento. Yu et al. han descrito que la IPN en pacientes tratados con radioterapia predice mayor riesgo de recurrencia bioquímica a los 5 años de seguimiento (371). Según Peng et al. la presencia de IPN en la biopsia de

próstata se puede considerar un factor de riesgo independiente de la reducción de la supervivencia global específica del CPr en pacientes de bajo riesgo tratados con radioterapia (374). Además, este estudio ha permitido demostrar que la expresión de SP a nivel nuclear se relaciona de manera estadísticamente significativa con la IPN, resultados que concuerdan con los obtenidos por primera vez por Li et al. en 2013 (375), quienes afirman que la SP es un mediador de la interacción entre las células tumorales y el sistema nervioso, y promueve la proliferación, invasión y neurotropismo del cáncer de páncreas. Luego la SP parece promover la IPN en el cáncer. Por tanto, el tratamiento con antagonistas SP/NK-1R se puede convertir en una estrategia terapéutica para evitar la diseminación vía perineural del CPr.

De todas formas, según un estudio publicado por Lubig et al., en este mismo año, sería recomendable realizar un análisis cuantitativo del porcentaje de nervios positivos para la IPN más que una descripción cualitativa sobre la mera presencia de IPN, ya que la primera tiene un valor pronóstico más alto (376).

Es bien conocido que la mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer se debe a las metástasis del tumor primario, que en el pulmón alcanza el 90%. Está bien establecido, que el CPr tiene una elevada afinidad por generar metástasis en el hueso. En nuestro estudio, no se han encontrado metástasis a distancia. Pero sí recidivas bioquímicas.

La SP es un neurotransmisor que se distribuye tanto en el SNC como en el SNP y puede modular la formación de hueso osteoblástico a través de su receptor NK-1R. La SP, a altas concentraciones (10^{-8} M), estimula la proliferación

de las células madres estromales de la médula ósea (BMSC, de sus siglas en inglés) en ratones (Wang 2009). SP también se ha implicado en la prevención de la apoptosis y en la estimulación la proliferación celular en médula ósea irradiada de ratón regulando la vía apoptótica (An, 2011). Mei et al., experimentos se desarrollaron en células derivadas de esta línea celular MC3TC-E1 *osteoblastic-like cells*, desarrollaron la hipótesis de que la SP puede promover la diferenciación osteoblástica de las BMSC a través de la vía de señalización WNT/ β -Catenina que parece ser responsable de la proliferación de las mismas, mediante la activación de genes dianas (c-myc, c-jun, fra-1 y ciclina D1) (377,378). Estos. Por el contrario, los antagonistas del receptor NK-1R pueden inhibir la proliferación de las BMSC. Estos hallazgos pueden esclarecer el papel del sistema nervioso en la reparación ósea (377). Wang et al., implicaron al péptido relacionado con el gen del calcitonina, que es segregado también por el SNP, con la promoción de la diferenciación de la línea celular MC3TC-E1 *osteoblastic-like cells* (379). En este experimento, encontramos que el neuropéptido SP podría promover la diferenciación osteoblástica a través de la señalización Wnt y podría mejorar la capacidad angiogénica de las BMSC.

Está bien establecido que el aumento de las fibras nerviosas en los tumores podría ser relevante para el aumento de la tasa de crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. Según Rameshwar et al., la PPT-1 desempeña un papel destacable en la regulación hematopoyética (380). Esta y otras funciones de la PPT-1 sugieren que su expresión aumentada en las células de la médula ósea puede favorecer el alojamiento, la integración de las células tumorales y la modificación eventual del microambiente de la propia médula ósea (265).

Algunos cánceres que sobreexpresan PPT-1 metastatizan a la médula ósea. Algunos autores, sugieren que la disección detallada de las vías neuroendocrino-tumorigénicas puede ser importante para las intervenciones terapéuticas efectivas en el desarrollo de ciertos tumores como el cáncer de mama y la metástasis en su sitio preferencial como en la médula ósea (381–383).

Ha quedado demostrado cómo tanto en las células neoplásicas como en las del estroma de los casos estudiados se expresan SP y NK-1R. Asimismo, se ha detectado la existencia de NK-1R en los vasos sanguíneos situados en el estroma adyacente al tumor. Esto puede tener relevantes implicaciones clínicas, especialmente a la hora de seleccionar terapias dirigidas a inhibir la formación de neovasos.

Las diferencias detectadas en la expresión (distribución e intensidad de tinción) de la SP y NK-1R entre las células neoplásicas y las normales pueden estar relacionada con el papel mitogénico del neuropéptido estudiado. Todos estos hallazgos son equiparables a los encontrados en todos los estudios previos con diferentes estirpes de tumores humanos (249,297,384).

El papel de la SP como agente promotor de la proliferación celular aún no es del todo conocida, como tampoco lo es el papel estimulador de la angiogénesis de su receptor específico NK-1R. Se sabe que cuando la SP se une a su receptor específico NK-1R se produce una activación de la cascada de las proteínas-quinazas activadas por mitógeno (MAPK, de las siglas en inglés - *mitogen-activated protein kinase*-) incluyendo las quinazas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2) y la p38MAPK. Estas rutas son a menudo

activadas bajo distintas condiciones y pueden llevar tanto al crecimiento como a la apoptosis celular (385,386). El mecanismo por el que este tipo de señal se transmite de forma específica está en fase de estudio y parecen jugar un papel relevante ciertas proteínas del citoesqueleto y las proteínas señalizadoras (5,387). El mecanismo principal por que los receptores de factores de crecimiento ligados al GMP-cíclico (GMPc-R, de sus siglas en inglés) activan la ruta MAPK es por la liberación de las subunidades β y γ de las proteínas G. Estas subunidades reclutan componentes tanto de la vía Ras, como de las vías Shc, Grb2 y Scr que conducen a la activación de la proteína Raf-1 y MAPK-1, un activador específico del ERK1/2 (388,389). La alteración de cualquiera de estos 4 puntos confiere a la célula la habilidad de dividirse con independencia de las señales de crecimientos presentes en el medio extracelular.

Dentro de la vía MAPK se ha identificado recientemente la β -arrestina, cuyo papel asignado en un principio fue el de mediar el desacoplamiento y la internalización del receptor. Actualmente, se piensa que esta proteína juega un papel relevante en la activación del ERK1/2 en muchos de los receptores GMPc-R (390–392). En el caso de los receptores activados por proteínas 2 (PAR2), la β -arrestina forman un complejo con el receptor internalizado, Raf-1 y ERK1/2, reteniendo las quinasas activadas en el citosol. Por otro lado, los complejos de proteínas estructurales, pueden determinar la localización subcelular y la especificidad del ERK1/2 y de este modo, dirigir el potencial mitogénico de una señal dada. Existe una variante del complejo β -arrestina que contiene el receptor adrenérgico β 2 y la tirosin-cinasa Scr, la cual conduce también a la activación del ERK1/2. No obstante, esta ruta produce una respuesta celular distinta a la

anterior, posiblemente esto se deba a que las quinasas activadas por el mecanismo antes mencionado tengan una diferente localización subcelular.

La unión de la SP al NK-1R induce la formación de complejos multiproteicos cerca de la membrana plasmática que contienen NK-1R, β -arrestina, Src y ERK1/2. Una vez activado, ERK1/2 se transloca en el núcleo de tal modo que se induce la proliferación e inhibe el proceso de senescencia y la apoptosis. La SP estimula la proliferación celular mediante la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y de MAPK (393) activando metaloproteinasas de matriz que inducen la liberación de TGF.

Se ha podido demostrar la relación entre SP y ciertos oncogenes, así pues, Luo et al. demostraron que la SP induce la transcripción de RNA mensajero del protooncogen c-Myc en la línea celular U-373MG (6). En dicha línea celular, el uso de Tyrohostin A25, un bloqueador de la actividad tirosin-cinasa, inhibió significativamente la mitogénesis inducida por la SP, lo que sugiere la participación de la fosforilación por protein-cinasa en la función mitogénica de la SP. La estimulación del NK-1R activa la fosforilación de la tirosina y aumenta la actividad enzimática de ERK1/2 y de las MAPK.

La habilidad para regular la activación Ras y la ruta MAPK por parte del receptor acoplado a proteínas G es un punto de control para la regulación del crecimiento celular (394). Algunos autores indican que la activación de MAPK inducida por SP requiere la presencia de un dominio funcional EGFR-quinasa, así mismo se ha visto que la ruta de señalización de EGFR está relacionada con la activación Ras (395). Se ha demostrado que el mecanismo de activación del EGFR por parte del complejo SP/NK-1R en las células epiteliales del colon,

produce la activación de metaloproteinasas de la matriz (TAPI-1-sensitive), el cual es capaz de separar el precursor pro-TGF α anclado a membrana, conduciendo a la aparición de su forma madura en el espacio extracelular. El TGF α , que está relacionado con el EGFR, causa tanto su activación como la activación de la vía MAPK induciendo la proliferación de enterocitos y células de astrocitomas. Esta nueva ruta puede participar tanto en la proliferación celular mediada por SP de varias líneas celulares, como en las alteraciones de la mucosa en la colitis crónica. Finalmente, estas vías de señalización activadas por NK-1R tienen cierta relevancia en la creciente idea de que el complejo SP/NK-1R tiene capital importancia en el desarrollo y progresión del crecimiento de tumores de distinta etiología incluyendo cáncer de páncreas, gliomas, cáncer de mama así como adenocarcinoma de próstata, en humanos.

Se conoce que la SP estimula la división celular activando NK-1R tanto en células normales (252,263,396) como neoplásicas. Además se ha demostrado un aumento de la expresión del NK-1R en diferentes líneas celulares tumorales como U373 MG, U138 MG, UC11 MG y GAMG de las líneas celulares de gliomas humanos así como de astrocitomas y neuroblastomas. En este sentido, se ha confirmado una función mitogénica de la SP y NK-1R en la regeneración de tisular (397,398).

Los resultados del presente trabajo ponen de manifiesto que existe un alto grado de expresión de NK-1R en el adenocarcinoma prostático. Esto mismo se ha puesto de manifiesto en estudios previos sobre varias líneas celulares de gliomas humanos. En ellos, la presencia de NK-1R está estrictamente correlacionado con el efecto de la SP o la Neuroquinina A en el aumento de la

síntesis de DNA y proliferación celular. Diferentes estudios ya presentados muestran que la activación de NK-1R mediante concentraciones nanomolares de SP induce la síntesis de DNA y la mitogénesis en dicha línea celular,

Se conoce que la SP, actúa específicamente a través del NK-1R ya que al aplicar un antagonista de este receptor se produce una inhibición de la multiplicación celular, este efecto es reversible al añadir nuevamente SP, incrementándose de nuevo la mitogénesis. Esto mismo ha podido evidenciarse en otras líneas celulares, tanto procedentes de neuroblastoma (SKN-BE) como de retinoblastoma humano (WERI-Rb-1 y Y-79) (248,296,304,399).

Se ha comprobado, gracias a la inmunohistoquímica como la expresión del NK-1R se encuentra aumentada en diferentes células tumorales humanas en relación a las células normales del organismo (249,299,307,319,384).

Se ha propuesto que el incremento de la concentración de los receptores NK-1R en la superficie celular es el mecanismo por el que la SP produciría sólo en estas células un aumento de las señales mitogénicas contrarrestando las diferentes señales apoptóticas o señales pro-senescencia en la población de células neoplásicas (244).

La estabilidad del genoma y la protección frente a las transformaciones malignas son procesos en los que están involucrados una variedad de complejos mecanismos, como por ejemplo la inhibición permanente del ciclo celular cuando oncogén se activa (362–366). Parece que las células procedentes de lesiones premalignas conservan la capacidad de senescencia, cualidad que pierden las células tumorales (400). Estudios previos han demostrado que las células que escapan a la senescencia tienen un riesgo aumentado de transformación

maligna. La proliferación autónoma celular es una meta que alcanzan las células cancerosas por medio de la activación oncogenes promotores del crecimiento (5,50,68,200,271,402,406,407). Esta activación dispara la apoptosis celular en un intento de contrarrestar el desarrollo del cáncer (408). El mecanismo por el que el tumor contrarresta este intento de autólisis celular es desconocido. Se propone que la SP podría jugar un papel clave en este proceso todavía confuso. Así, la activación del ERK2 por el NK-1R podría producir la translocación celular del Nur-77, como ha sido demostrado por Castro-Obregon et al. (409). Esto podría representar un nuevo y rápido factor de crecimiento de supervivencia independiente de la regulación génica.

El hallazgo de que las células del CPr expresan SP/NK-1R, significa que existe un mecanismo autocrino-paracrino para la SP. Sería planteable la discusión terminológica para decidir si es más conveniente hablar de vía autocrina que nucleocrina. Según algunos autores la actividad autocrina es la que ocurre en células que sobreexpresan receptores en la membrana plasmática y que tras secreción del ligando y unión de éste con el citado receptor se produce una reacción en cascada que activa funciones celulares a nivel citoplásmico (175–177). El término nucleocrino sería más correcto ya que se ha visto que NK-1R una vez se ha unido con el ligando se internaliza en la célula y después se transloca al núcleo para ejercer su efecto mitogénico y antiapoptótico (177–180).

La liberación de SP por las células de CPr se unirían al receptor NK-1R, activando la migración de las células de cancerígenas para invadir y metastatizar. Por eso es fundamental bloquear el receptor NK-1R para evitar la

invasión y la metástasis de las células neoplásicas puesto que todas ellas expresan el receptor NK-1R y la SP.

Varios estudios sobre la expresión de NK-1R en distintos tipos de tumores, han puesto de manifiesto la presencia de este receptor tanto a nivel de la masa tumoral como en el estroma circundante y de los vasos sanguíneos asociados al tumor (299,308,309,322,410). Existen numerosas evidencias que demuestran la capacidad de los tumores para estimular la angiogénesis peritumoral que ejercen mediante la secreción de factores proangiogénicos. Se ha postulado, que la SP a través de su receptor NK-1R puede estimular la angiogénesis de una forma más simple que las vías clásicamente descritas; el crecimiento de la masa tumoral, la infiltración peritumoral y las metástasis a distancia.

La angiogénesis es un fenómeno esencial para garantizar la nutrición de la masa tumoral. Se trata de un proceso secuencial: en una primera fase se induce la proliferación endotelial, en una segunda se estimula la formación de vasos sanguíneos y el incremento de su flujo, y finalmente, la maduración de los sistemas de regulación endógenos neurovasculares. El proceso neoangiogénico asentado sobre vasos existentes es una característica común de los tejidos sometidos a inflamación crónica así como de aquellos en los que se ha producido una herida. Por otro lado, este proceso aparece también en el contexto de la progresión tumoral a medida que la masa va necesitando más recursos para su desarrollo.

Como se ha mencionado arriba, tanto la SP, NKA y NKB, actúan como neurotransmisores tanto a nivel del SNC como del periférico, Tanto las taquicininas como sus receptores pueden expresarse en células de estirpe no

neuronal contribuyendo a la correcta comunicación entre el sistema nervioso y los órganos periféricos: aparato genitourinario, gastrointestinal, cardiovascular, respiratorio, inmunitario, entre otros, El hecho de que las taquicininas estén relacionadas con tantas funciones fisiológicas puede justificar su sobreexpresión en procesos patológicos como el cáncer (411).

Históricamente, la posible relación entre los factores psicosociales y el desarrollo y evolución de las lesiones cancerosas ha atraído el interés de muchos científicos; pero este hecho que en bastantes ocasiones se comprueba en la clínica ha tenido hasta la actualidad un pobre sustento molecular. En numerosas ocasiones, se ha sugerido una posible asociación entre los trastornos emocionales y la aparición y progresión del cáncer (412). Por ejemplo, el cáncer de mama se ha relacionado con ciertos estilos de vida y con la exposición de varios tipos de agentes estresantes. Parece ser que los factores cruciales que afectan al crecimiento tumoral son el estrés, la personalidad individual, la existencia de apoyo psicosocial y la habilidad individual de hacer frente al estrés (413,414), A pesar de ello, hasta la actualidad, las pruebas que justifican a nivel molecular esta posible asociación entre el estado emocional y el cáncer no están suficientemente contrastadas.

2.18 Posibles usos clínicos de los antagonistas del NK-1R en el cáncer de próstata

Actualmente, los fármacos antineoplásicos de uso más común en la clínica tienen un perfil muy bajo de seguridad junto con un gran número de efectos secundarios, algunos de ellos muy graves como aquellos que afectan a la producción de células sanguíneas en la médula ósea o los que afectan a otros

órganos: hígado, corazón y sistema gastrointestinal, entre otros. Estos efectos indeseables aparecen debido a que la actividad que presentan no es selectiva para el tejido tumoral. La mayoría de los esfuerzos de la investigación con este tipo de fármacos se centran en crear moléculas con mejor perfil antitumoral y menos efectos secundarios. Con este fin se vienen diseñando terapias dirigidas al tipo de célula tumoral más que al tipo de tumor. Existe un acuerdo general de que el aumento de la angiogénesis es un factor importante en el desarrollo y el pronóstico del CPr. Por ello, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) desempeña un papel principal en los eventos moleculares que conducen a la progresión del CPr, desde la dependencia de andrógenos hasta la resistencia a la castración hasta la diseminación al esqueleto, bevacizumab es un anticuerpo monoclonal recombinante anti-VEGF que ha exhibido actividad clínica en diferentes tipos de cáncer. Recientemente, se obtuvieron resultados prometedores, utilizando bevacizumab en combinación con terapia de privación de andrógenos (ADT) en pacientes con CPr sensible a hormonas recurrente después de la terapia local definitiva. En el CPr resistente a la castración metastásico (mCRPC), se ha descrito actividad antitumoral, aunque sin mejoras en la supervivencia general y con una amplia gama de efectos secundarios (415).

El complejo SP/NK-1R es una vía de señalización fundamental en la regulación del crecimiento celular y un objetivo potente para el desarrollo de nuevos tratamientos antineoplásicos. Mayordomo et al., (416) describieron que la inhibición de SP con anticuerpos inhibe de manera relevante el crecimiento celular e induce la apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama, colon y próstata. Estos efectos se asociaron a una disminución en la vía de activación de la quinasa activada por mitógenos. En algunas líneas celulares la inhibición

de la SP disminuyó el estado estacionario de Her2 y EGFR, por los que se piensa que la señalización mediada por SP es importante para la actividad basal de estos receptores ErbB. En consecuencia, observamos un bloqueo de la progresión del ciclo celular y la inhibición de varias proteínas relacionadas con el ciclo celular, incluida la mTOR. La inhibición de SP también indujo la muerte celular en líneas celulares resistentes a Lapatinib y Trastuzumab que tienen niveles aumentados de Her2 activo, lo que sugiere que este enfoque terapéutico podría ser también efectivo para aquellos cánceres resistentes a las terapias anti-ErbB actuales.

La acción de los antagonistas del NK-1R es dosis-dependiente. A bajas dosis actúan sobre los NK-1R localizados en el tronco del encéfalo, concretamente en el núcleo glosofaríngeo, produciendo un efecto antiemético en situaciones de vómitos incoercibles secundarios a fármacos citostáticos. Si la dosis aumenta, los antagonistas actúan a nivel central, en el sistema límbico (amígdala, hipotálamo, núcleos basales y áreas relacionadas con el comportamiento emocional), produciendo un efecto ansiolítico y antidepresivo. A dosis mayores, actúan sobre ciertas áreas cerebrales como analgésico central. Y a dosis aún mayores, poseen actividad antiinflamatoria. A estas mismas dosis o algo superiores, dependiendo del tumor en cuestión y de su estadio, los antagonistas del NK-1R desempeñan una actividad antitumoral (inhibición de la proliferación tumoral, inhibición de la producción de metástasis, inhibición de la reacción inflamatoria peritumoral y de la angiogénesis). Esto, junto con el hecho de que algunos preparados pueden ser administrados por vía oral y a que cruzan la barrera hematoencefálica, indica que los antagonistas del NK-1R se pueden

posicionar como un prometedor grupo de fármacos para el control y tratamiento de los tumores malignos.

Muñoz et al., demostraron la actividad antitumoral in vitro de Aprepitant en varias líneas celulares de cáncer, obteniendo unos resultados similares a los obtenidos con otros antagonistas del NK-1R (417). Queda por tanto probado la acción antitumoral in vitro de un fármaco ya comercializado. Futuras investigaciones podrían reconocer el uso de Aprepitant como fármaco antitumoral.

Así mismo, Berger et al. y Muñoz et al., en 2014 realizaron estudios in vivo mediante xenoinjerto en ratones, para demostrar la utilidad del complejo SP/NK-1R como un potencial objetivo para el tratamiento antitumoral. Estos autores demostraron que la estimulación de las células tumorales con SP causa un aumento en la tasa del crecimiento del tumor y la administración de sustancias antagonistas del NK-1R producen una inhibición de este crecimiento; lo que demuestra la actividad antitumoral in vivo de Aprepitant en animales de experimentación (303,418).

2.20 Propuestas de estudio futuros

A pesar los resultados obtenidos, todavía queda mucho por hacer para poder considerar a este grupo de fármacos como una alternativa real para el tratamiento del cáncer. Quedan pendientes ciertos puntos a investigar en relación con los antagonistas del NK-1R:

1. Continuar con estudios que demuestren la expresión de SP/NK-1R en otros tumores.
2. Realizar un estudio prospectivo con una muestra más amplia de pacientes con CPr, para comparar la evolución de los pacientes con expresión alta de SP/NK-1R y pacientes con expresión nula-débil.
3. Seguir investigando la acción in vitro de los antagonistas del NK-1R en otras líneas celulares tumorales y el uso concomitante con otros fármacos antineoplásicos.
4. Realizar estudios in vivo en animales de experimentación, En este sentido sería conveniente llevar a cabo esta investigación en ratones “desnudos”.
5. Llevar a cabo Ensayos Clínicos con los fármacos antagonistas de NK-1R aprobados por la Agencia Europea del Medicamento.

Conclusiones

5 CONCLUSIONES

1. Por primera vez se ha demostrado que SP/NK-1R se expresan tanto en células normales como en células tumorales del CPr, así como en las células estromales.
2. Es la primera vez que se pone de manifiesto que tanto SP como su receptor NK-1R se expresan en el CPr humano, siendo superior en el tejido tumoral que en el normal.
3. Por vez primera se ha identificado la asociación entre la expresión de SP/NK-1R con la supervivencia libre de enfermedad a 1, 5 y 10 años y por tanto con la aparición de recidivas bioquímicas.
4. Se ha establecido por primera vez que los tumores con una puntuación de Gleason ≥ 7 expresan más SP/NK-1R que los de menor grado, especialmente a nivel nuclear de las células tumorales y en las células estromales.
5. Los tumores que desarrollaron una recidiva bioquímica antes de los 5 o 10 años de evolución postquirúrgica presentaban mayor expresión de SP/NK-1R en el tejido prostático.
6. La expresión de Bcl2 y p53 se asocian a niveles más altos de expresión de SP a nivel nuclear y de NK-1R a nivel del citoplasma, pero no se ha podido demostrar la asociación de Bcl2 y p53 con la SLE.
7. Se hacen necesarios estudios prospectivos con mayor muestra para establecer definitivamente las asociaciones arriba descritas.
8. La expresión de SP/NK-1R en las células del CPr contribuye a una mejor comprensión de este tipo de tumor

Aportaciones de esta tesis al conocimiento sobre el cáncer de próstata y al abordaje clínico-asistencial

- Se ha demostrado que tanto la próstata normal como la tumoral expresan SP y NK-1R, siendo significativamente superior la expresión en el tejido tumoral.
- Que la expresión de SP/NK-1R es un factor de riesgo de progresión, recidiva y metástasis del CPr.
- Por todo ello, habría que analizar la eficacia y efectividad de los antagonistas NK-1R para el tratamiento en monoterapia o terapia combinada del CPr.

Bibliografía

6 BIBLIOGRAFÍA

1. International Agency for Research on Cancer (IARC). World cancer report. Stewart BW, Wild CP, editors. Ginebra, Suiza: WHO Press, World Health Organization; 2014. p. 632.
2. Meshki J, Douglas SD, Lai JP, Schwartz L, Kilpatrick LE, Tuluc F. Neurokinin 1 receptor mediates membrane blebbing in HEK293 cells through a Rho/Rho-associated coiled-coil kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2009/01/31. 2009;284(14):9280–9.
3. Muñoz M, Coveñas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in cancer progression. *Peptides*. 2013/08/13. 2013;48:1–9.
4. Lewis KM, Harford-Wright E, Vink R, Nimmo AJ, Ghabriel MN. Walker 256 tumour cells increase substance P immunoreactivity locally and modify the properties of the blood-brain barrier during extravasation and brain invasion. *Clin Exp Metastasis*. 2012/05/23. 2013;30(1):1–12.
5. DeFea KA, Vaughn ZD, O'Bryan EM, Nishijima D, Dery O, Bunnett NW. The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep;97(20):11086–91.
6. Luo W, Sharif TR, Sharif M. Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res*. 1996 Nov;56(21):4983–91.
7. Li X, Ma G, Ma Q, Li W, Liu J, Han L, et al. Neurotransmitter substance P

- mediates pancreatic cancer perineural invasion via NK-1R in cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2013/01/25. 2013;11(3):294–302.
8. Muñoz M, Coveñas R. Substance P, the NK-1 Receptor and NK-1 Receptor Antagonists in Cancer Treatment. *Front Anti-Cancer Drug Discov.* 2014;4:3.
 9. Latarjet M, Ruiz Liard A. Anatomía humana [Internet]. Buenos Aires : Médica Panamericana; 2012 [cited 2018 Sep 3]. Available from: http://encore.fama.us.es/iii/encore/record/C__Rb2662238__Sanatomia humana latarjet__Orightresult__U__X2?lang=spi&suite=cobalt
 10. Moore KL. Anatomía con Orientación Clínica [Internet]. Philadelphia : WOLTERS KLUWER; 2018 [cited 2018 Sep 3]. Available from: http://encore.fama.us.es/iii/encore/record/C__Rb2853143__SMoore Agur anatomia__Orightresult__U__X2?lang=spi&suite=cobalt
 11. Rohen JW, Yokochi C, Lütjen Drecoll E. Atlas de anatomía humana : estudio fotográfico del cuerpo humano [Internet]. Barcelona : Elsevier; 2015 [cited 2018 Sep 3]. Available from: http://encore.fama.us.es/iii/encore/record/C__Rb2669270__SRohen anatomia__Orightresult__U__X2?lang=spi&suite=cobalt
 12. McNeal JE. Normal and pathologic anatomy of prostate. *Urology.* 1981 Mar;17(Suppl 3):11–6.
 13. McNeal JE. Normal anatomy of the prostate and changes in benign prostatic hypertrophy and carcinoma. *Semin Ultrasound CT MR.* 1988 Oct;9(5):329–34.

14. McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. Prostate [Internet]. 1981 Sep 3;2(1):35–49. Available from: <https://doi.org/10.1002/pros.2990020105>
15. McNeal JE. Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. Prog Clin Biol Res. 1984;145:27–53.
16. Selman SH. The McNeal Prostate: A Review. Urology [Internet]. 2011;78(6):1224–8. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ccm&AN=104608405&site=eds-live>
17. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Sistema urogenital. In: Embriología clínica [Internet]. 9th ed. Barcelona: Elsevier España, SLU; 2013. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsebk&AN=974493&site=eds-live>
18. Carlson BM. Sistema urogenital. In: Embriología humana y biología del desarrollo StudentConsult [Internet]. 5th ed. Barcelona: Elsevier España, SLU; 2014. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsebk&AN=973267&site=eds-live>
19. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Próstata. In: Patología estructural y funcional de Robbins y Cotran. 9ª. Barcelona, España: Elsevier España, S.L.U.; 2015.
20. Mills SE. Prostate. In: Mills SE, editor. Histology For Pathologists. 4th ed.

- Philadelphia: Lippincott Williams And Wilkins; 2012. p. 1328.
21. McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol.* 1988 Aug;12(8):619–33.
 22. Martín Lacave I. Atlas de histología humana [Internet]. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 2017. Available from: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/pruebademo/detail.action?docID=4870378>
 23. Kierszenbaum AL, Tres L. Transporte y maduración del espermatozoide. Glándula prostática. In: *Histología y Biología Celular; Introducción a la anatomía patológica.* 3ª. Barcelona: Elsevier Health Sciences; 2012.
 24. Alves EF, de Freitas Ribeiro BLM, Costa WS, Gallo CBM, Sampaio FJB. Histological and quantitative analyzes of the stromal and acinar components of normal human prostate zones. *Prostate.* 2018 Mar;78(4):289–93.
 25. Cohen RJ, Shannon BA, Phillips M, Moorin RE, Wheeler TM, Garrett KL. Central zone carcinoma of the prostate gland: a distinct tumor type with poor prognostic features. *J Urol.* 2008 May;179(5):1762–7; discussion 1767.
 26. McNeal J. Central zone histology of the prostate. Vol. 34, *Human pathology.* United States; 2003. p. 298; author reply 298-9.
 27. Srodon M, Epstein JI. Central zone histology of the prostate: a mimicker of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol.* 2002 May;33(5):518–23.

28. Amin M, Khalid A, Tazeen N, Yasoob M. Zonal anatomy of prostate. *Ann King Edward Med Univ.* 2010;16(3):138.
29. Chagas MA, Babinski MA, Costa WS, Sampaio FJB. Stromal and acinar components of the transition zone in normal and hyperplastic human prostate. *BJU Int.* 2002 May;89(7):699–702.
30. Leimgruber C, Quintar AA, Sosa LD V, Garcia LN, Figueredo M, Maldonado CA. Dedifferentiation of prostate smooth muscle cells in response to bacterial LPS. *Prostate.* 2011 Jul;71(10):1097–107.
31. Zhang Y, Nojima S, Nakayama H, Jin Y, Enza H. Characteristics of normal stromal components and their correlation with cancer occurrence in human prostate. *Oncol Rep.* 2003;10(1):207–11.
32. Powell MS, Li R, Dai H, Sayeeduddin M, Wheeler TM, Ayala GE. Neuroanatomy of the normal prostate. *Prostate.* 2005 Sep;65(1):52–7.
33. Costa WS, de Carvalho AM, Babinski MA, Chagas MA, Sampaio FJB. Volumetric density of elastic and reticular fibers in transition zone of controls and patients with benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 2004 Oct;64(4):693–7.
34. Kruslin B, Ulamec M, Tomas D. Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression. *Bosn J basic Med Sci.* 2015 May;15(2):1–8.
35. Farris MS, Courneya KS, Kopciuk KA, McGregor SE, Friedenreich CM. Post-diagnosis alcohol intake and prostate cancer survival: A population-based cohort study. *Int J cancer.* 2018 Jul;143(2):253–62.

36. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2016 Jun;1863(6, Part A):1238–60. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488916300416>
37. Maitland NJ, Frame FM, Polson ES, Lewis JL, Collins AT. Prostate cancer stem cells: do they have a basal or luminal phenotype? *Horm Cancer*. 2011 Feb;2(1):47–61.
38. Abbate GM, Mangano A, Sacerdote P, Amodeo G, Moschetti G, Levrini L. Substance P expression in the gingival tissue after upper third molar extraction: effect of ketoprofen, a preliminary study. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2017/03/25. 2017;31(1):239–44.
39. Abdel-Rahman O. Validation of American Joint Committee on Cancer eighth staging system among prostate cancer patients treated with radical prostatectomy. *Ther Adv Urol* [Internet]. 2018 Feb;10(2):35–42. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5805006/pdf/10.1177_1756287217737706.pdf
40. Abeshouse A, Ahn J, Akbani R, Ally A, Amin S, Andry CD, et al. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* [Internet]. 2015;163(4):1011–25. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867415013392>
41. Frame FM, Maitland NJ. Cancer stem cells, models of study and implications of therapy resistance mechanisms. *Adv Exp Med Biol*.

- 2011;720:105–18.
42. Egevad L, Samaratunga H, Srigley JR, Delahunt B. New Gleason grading system: Statement from the editors of 6 journals. Vol. 34, Urologic oncology. United States; 2016. p. 479–80.
 43. Kryvenko ON, Epstein JI. Prostate Cancer Grading: A Decade After the 2005 Modified Gleason Grading System. Arch Pathol Lab Med. 2016 Oct;140(10):1140–52.
 44. Sun G-X, Shen P-F, Zhang X-M, Gong J, Gui H-J, Shu K-P, et al. Predictive efficacy of the 2014 International Society of Urological Pathology Gleason grading system in initially diagnosed metastatic prostate cancer. Asian J Androl. 2017;19(5):573–8.
 45. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. 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. 2016 Feb;40(2):244–52.
 46. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. Cancer Chemother reports. 1966 Mar;50(3):125–8.
 47. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. J Urol. 1974 Jan;111(1):58–64.
 48. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. Hum Pathol. 1992 Mar;23(3):273–9.

49. Alcaraz A, Hammerer P, Tubaro A, Schröder FH, Castro R. Is There Evidence of a Relationship between Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer? Findings of a Literature Review. *Eur Urol* [Internet]. 2009;55(4):864–75. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0302283808013158>
50. Akazawa T, Kwatra SG, Goldsmith LE, Richardson MD, Cox EA, Sampson JH, et al. A constitutively active form of neurokinin 1 receptor and neurokinin 1 receptor-mediated apoptosis in glioblastomas. *J Neurochem*. 2009/06/13. 2009;109(4):1079–86.
51. Ahadova A, Gallon R, Gebert J, Ballhausen A, Endris V, Kirchner M, et al. Three molecular pathways model colorectal carcinogenesis in Lynch syndrome. *Int J cancer*. 2018 Feb;
52. Cooperberg MR, Broering JM, Kantoff PW, Carroll PR. Contemporary Trends in Low Risk Prostate Cancer: Risk Assessment and Treatment. *J Urol* [Internet]. 2007;178(3, Supplement):S14--S19. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022534707008233>
53. Penson DF, Rossignol M, Sartor AO, Scardino PT, Abenhaim LL. Prostate Cancer: Epidemiology and Health-related Quality of Life. *Urology* [Internet]. 2008;72(6, Supplement):S3--S11. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090429508017342>
54. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Actas Urológicas Españolas*

- (English Ed [Internet]. 2011;35(10):565–79. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2173578612000091>
55. Attard G, Parker C, Eeles RA, Schröder F, Tomlins SA, Tannock I, et al. Prostate cancer. *Lancet* [Internet]. 2016;387(10013):70–82. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673614619474>
56. Catalona WJ. Management of cancer of the prostate. *N Engl J Med* [Internet]. 1994 Oct;331(15):996–1004. Available from:
<https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM199410133311507>
57. Meiser B, Cowan R, Costello A, Giles GG, Lindeman GJ, Gaff CL. Prostate Cancer Screening in Men with a Family History of Prostate Cancer: The Role of Partners in Influencing Men’s Screening Uptake. *Urology* [Internet]. 2007;70(4):738–42. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090429507017724>
58. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
59. Jones RJ, Armstrong SA. Cancer stem cells in hematopoietic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Jan;14(1 Suppl 1):12–6.
60. Jones RJ. Cancer stem cells-clinical relevance. *J Mol Med (Berl)*. 2009 Nov;87(11):1105–10.
61. Jones RJ. Controversies in cancer stem cells. Vol. 87, *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. Germany; 2009. p. 1077–8.

62. Hermann PC, Bhaskar S, Cioffi M, Heeschen C. Cancer stem cells in solid tumors. *Semin Cancer Biol.* 2010 Apr;20(2):77–84.
63. Shand RL, Gelmann EP. Molecular biology of prostate-cancer pathogenesis. *Curr Opin Urol.* 2006 May;16(3):123–31.
64. Gonzalvo ML, Isaacs WB. Molecular pathways to prostate cancer. *J Urol.* 2003 Dec;170(6 Pt 1):2444–52.
65. Graham MK, Meeker A. Telomeres and telomerase in prostate cancer development and therapy. *Nat Rev Urol.* 2017 Oct;14(10):607–19.
66. Hurwitz LM, Heaphy CM, Joshu CE, Isaacs WB, Konishi Y, De Marzo AM, et al. Telomere length as a risk factor for hereditary prostate cancer. *Prostate.* 2014 Apr;74(4):359–64.
67. Heaphy CM, Gaonkar G, Peskoe SB, Joshu CE, De Marzo AM, Lucia MS, et al. Prostate stromal cell telomere shortening is associated with risk of prostate cancer in the placebo arm of the Prostate Cancer Prevention Trial. *Prostate.* 2015 Aug;75(11):1160–6.
68. Pihan GA, Doxsey SJ. The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin Cancer Biol.* 1999 Aug;9(4):289–302.
69. Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, et al. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res.* 1998 Sep;58(17):3974–85.
70. Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Malhotra R, Liotta L, Doxsey SJ. Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progression. *Cancer Res.* 2001

- Mar;61(5):2212–9.
71. Pihan GA. Centrosome dysfunction contributes to chromosome instability, chromoanagenesis, and genome reprogramming in cancer. *Front Oncol.* 2013;3:277.
 72. Pihan GA, Wallace J, Zhou Y, Doxsey SJ. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res.* 2003 Mar;63(6):1398–404.
 73. Meeker AK. Cancer telomeres and white crows. *Am J Clin Exp Urol.* 2018;6(2):93–100.
 74. Heaphy CM, Yoon GS, Peskoe SB, Joshu CE, Lee TK, Giovannucci E, et al. Prostate cancer cell telomere length variability and stromal cell telomere length as prognostic markers for metastasis and death. *Cancer Discov.* 2013 Oct;3(10):1130–41.
 75. Meeker AK. Telomeres and telomerase in prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer biology. *Urol Oncol.* 2006;24(2):122–30.
 76. Meeker AK, Hicks JL, Iacobuzio-Donahue CA, Montgomery EA, Westra WH, Chan TY, et al. Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2004 May;10(10):3317–26.
 77. Meeker AK, Hicks JL, Platz EA, March GE, Bennett CJ, Delannoy MJ, et al. Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* 2002 Nov;62(22):6405–9.
 78. Meeker AK, Gage WR, Hicks JL, Simon I, Coffman JR, Platz EA, et al.

- Telomere length assessment in human archival tissues: combined telomere fluorescence in situ hybridization and immunostaining. *Am J Pathol.* 2002 Apr;160(4):1259–68.
79. Sommerfeld HJ, Meeker AK, Piatyszek MA, Bova GS, Shay JW, Coffey DS. Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res.* 1996 Jan;56(1):218–22.
80. Joshu CE, Peskoe SB, Heaphy CM, Kenfield SA, Mucci LA, Giovannucci EL, et al. Current or recent smoking is associated with more variable telomere length in prostate stromal cells and prostate cancer cells. *Prostate.* 2018 Feb;78(3):233–8.
81. Di Sebastiano KM, Mourtzakis M. The role of dietary fat throughout the prostate cancer trajectory. *Nutrients.* 2014 Dec;6(12):6095–109.
82. Liang PS, Chen T-Y, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J cancer.* 2009 May;124(10):2406–15.
83. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2011 Sep;22(9):1958–72.
84. Sutcliffe S, Platz EA. Inflammation in the etiology of prostate cancer: An epidemiologic perspective. *Urol Oncol Semin Orig Investig [Internet].* 2007;25(3):242–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1078143906002316>

85. Morrison WB. Inflammation and cancer: a comparative view. *J Vet Intern Med.* 2012;26(1):18–31.
86. Chisari F V. Rous-Whipple Award Lecture. Viruses, immunity, and cancer: lessons from hepatitis B. *Am J Pathol.* 2000 Apr;156(4):1117–32.
87. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002 Dec;420(6917):860–7.
88. Dennis LK, Lynch CF, Torner JC. Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology [Internet].* 2002;60(1):78–83. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090429502016370>
89. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2006 Jan;6(1):24–37.
90. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007 Apr;7(4):256–69.
91. Platz EA, De Marzo AM. Epidemiology of Inflammation and Prostate Cancer. *J Urol [Internet].* 2004;171(2, Supplement):S36--S40. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022534705625165>
92. Nelson WG, De Marzo AM, DeWeese TL, Isaacs WB. THE ROLE OF INFLAMMATION IN THE PATHOGENESIS OF PROSTATE CANCER. *J Urol [Internet].* 2004;172(5, Supplement):S6--S12. Available from:

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022534705613006>
93. Ames BN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1995 Jun;92(12):5258–65. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC41674/pdf/pnas01488-0017.pdf>
 94. Porta C, Larghi P, Rimoldi M, Totaro MG, Allavena P, Mantovani A, et al. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. Immunobiology. 2009;214(9–10):761–77.
 95. Haylock RGE, Gillies M, Hunter N, Zhang W, Phillipson M. Cancer mortality and incidence following external occupational radiation exposure: an update of the 3rd analysis of the UK national registry for radiation workers. Br J Cancer. 2018 Aug;
 96. Gathirua-Mwangi WG, Zhang J. Dietary factors and risk for advanced prostate cancer. Eur J Cancer Prev. 2014 Mar;23(2):96–109.
 97. Bosland MC, Oakley-Girvan I, Whittemore AS. Dietary fat, calories, and prostate cancer risk. Vol. 91, Journal of the National Cancer Institute. United States; 1999. p. 489–91.
 98. Hayes RB. Are dietary fat and vasectomy risk factors for prostate cancer? Vol. 87, Journal of the National Cancer Institute. United States; 1995. p. 629–31.
 99. Rose DP, Connolly JM. Dietary fat, fatty acids and prostate cancer. Lipids. 1992 Oct;27(10):798–803.
 100. Whittemore AS, Kolonel LN, Wu AH, John EM, Gallagher RP, Howe GR,

- et al. Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst.* 1995 May;87(9):652–61.
101. Rose DP, Boyar AP, Wynder EL. International comparisons of mortality rates for cancer of the breast, ovary, prostate, and colon, and per capita food consumption. *Cancer.* 1986 Dec;58(11):2363–71.
102. Zhang J, Dhakal IB, Zhao Z, Li L. Trends in mortality from cancers of the breast, colon, prostate, esophagus, and stomach in East Asia: role of nutrition transition. *Eur J Cancer Prev.* 2012 Sep;21(5):480–9. Trends in mortality from cancers of the breasts. *Eur J Cancer Prev.* 2012 Sep;21(5):480–9.
103. Ahnen DJ, Wade SW, Jones WF, Sifri R, Mendoza Silveiras J, Greenamyre J, et al. The increasing incidence of young-onset colorectal cancer: a call to action. *Mayo Clin Proc.* 2014 Feb;89(2):216–24.
104. Meyer F, Bairati I, Fradet Y, Moore L. Dietary energy and nutrients in relation to preclinical prostate cancer. *Nutr Cancer.* 1997;29(2):120–6.
105. Bairati I, Meyer F, Fradet Y, Moore L. Dietary fat and advanced prostate cancer. *J Urol.* 1998 Apr;159(4):1271–5.
106. Meyer F, Bairati I, Shadmani R, Fradet Y, Moore L. Dietary fat and prostate cancer survival. *Cancer Causes Control.* 1999 Aug;10(4):245–51.
107. Fradet Y, Meyer F, Bairati I, Shadmani R, Moore L. Dietary fat and prostate cancer progression and survival. *Eur Urol.* 1999;35(5–6):388–91.
108. De Stefani E, Deneo-Pellegrini H, Boffetta P, Ronco A, Mendilaharsu M.

- Alpha-linolenic acid and risk of prostate cancer: a case-control study in Uruguay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000 Mar;9(3):335–8.
109. Vykhovanets E V, Shankar E, Vykhovanets O V, Shukla S, Gupta S. High-fat diet increases NF-kappaB signaling in the prostate of reporter mice. *Prostate.* 2011 Feb;71(2):147–56.
110. Shankar E, Vykhovanets E V, Vykhovanets O V, Maclennan GT, Singh R, Bhaskaran N, et al. High-fat diet activates pro-inflammatory response in the prostate through association of Stat-3 and NF-kappaB. *Prostate.* 2012 Feb;72(3):233–43.
111. Hill MJ. Dietary fat and human cancer (review). *Anticancer Res.* 1987;7(3 Pt A):281–92.
112. De Marzo AM, DeWeese TL, Platz EA, Meeker AK, Nakayama M, Epstein JI, et al. Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment. *J Cell Biochem.* 2004 Feb;91(3):459–77.
113. De Marzo AM, Nakai Y, Nelson WG. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol.* 2007;25(5):398–400.
114. Staal J, Beyaert R. Inflammation and NF-kappaB Signaling in Prostate Cancer: Mechanisms and Clinical Implications. *Cells.* 2018 Aug;7(9).
115. Freedman ML, Haiman CA, Patterson N, McDonald GJ, Tandon A, Waliszewska A, et al. Admixture mapping identifies 8q24 as a prostate cancer risk locus in African-American men. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep;103(38):14068–73.

116. Amundadottir LT, Sulem P, Gudmundsson J, Helgason A, Baker A, Agnarsson BA, et al. A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nat Genet.* 2006 Jun;38(6):652–8.
117. Witte JS. Multiple prostate cancer risk variants on 8q24. Vol. 39, *Nature genetics.* United States; 2007. p. 579–80.
118. Ghoussaini M, Song H, Koessler T, Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Driver KE, et al. Multiple loci with different cancer specificities within the 8q24 gene desert. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Jul;100(13):962–6.
119. Li R, Qin Z, Tang J, Han P, Xing Q, Wang F, et al. Association between 8q24 Gene Polymorphisms and the Risk of Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Cancer.* 2017;8(16):3198–211.
120. Arnold RS, Fedewa SA, Goodman M, Osunkoya AO, Kissick HT, Morrissey C, et al. Bone metastasis in prostate cancer: Recurring mitochondrial DNA mutation reveals selective pressure exerted by the bone microenvironment. *Bone* [Internet]. 2015 Sep;78:81–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4466124/pdf/nihms687538.pdf>
121. Hopkins JF, Sabelnykova VY, Weischenfeldt J, Simon R, Aguiar JA, Alkallas R, et al. Mitochondrial mutations drive prostate cancer aggression. *Nat Commun.* 2017 Sep;8(1):656.
122. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J cancer.* 2007 Dec;121(11):2373–80.
123. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*

- (London, England). 2001 Feb;357(9255):539–45.
124. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol.* 1999 Dec;155(6):1985–92.
125. De Marzo AM, Nelson WG, Meeker AK, Coffey DS. Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *J Urol.* 1998 Dec;160(6 Pt 2):2381–92.
126. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867411001279>
127. Lewis CE, Harney AS, Pollard JW. The Multifaceted Role of Perivascular Macrophages in Tumors. *Cancer Cell.* 2016 Aug;30(2):365.
128. Neill MG, Fleshner NE. An update on chemoprevention strategies in prostate cancer for 2006. *Curr Opin Urol.* 2006 May;16(3):132–7.
129. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell.* 2000 Oct;103(3):481–90.
130. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 2006 Jan;66(2):605–12.
131. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell.* 2006 Jan;124(2):263–6.
132. Lane JA, Oliver SE, Appleby PN, Lentjes MAH, Emmett P, Kuh D, et al.

- Prostate cancer risk related to foods, food groups, macronutrients and micronutrients derived from the UK Dietary Cohort Consortium food diaries. *Eur J Clin Nutr.* 2017 Apr;71(4):567.
133. Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature.* 2006 Jul;442(7101):461–5.
134. Sutcliffe S, Giovannucci E, De Marzo AM, Leitzmann MF, Willett WC, Platz EA. Gonorrhea, syphilis, clinical prostatitis, and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Nov;15(11):2160–6.
135. Murphy GP, Busch C, Abrahamsson PA, Epstein JI, McNeal JE, Miller GJ, et al. Histopathology of localized prostate cancer. Consensus Conference on Diagnosis and Prognostic Parameters in Localized Prostate Cancer. Stockholm, Sweden, May 12-13, 1993. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 1994;162:7–27.
136. TOTTEN RS, HEINEMANN MW, HUDSON PB, SPROUL EE, STOUT AP. Microscopic differential diagnosis of latent carcinoma of prostate. *AMA Arch Pathol.* 1953 Feb;55(2):131–41.
137. Gown AM, Vogel AM. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. II. Distribution of filament proteins in normal human tissues. *Am J Pathol.* 1984 Feb;114(2):309–21.
138. Weinstein MH, Signoretti S, Loda M. Diagnostic utility of immunohistochemical staining for p63, a sensitive marker of prostatic basal cells. *Mod Pathol.* 2002;15(12):1302–8.

139. Nemanqani DM, Aftab K, Al-Malki SH, Al-Sufyani WM. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Colorectal Adenocarcinoma and its Correlation with Clinicopathological Factors. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2018 Jul;28(7):527–31.
140. Luo J, Zha S, Gage WR, Dunn TA, Hicks JL, Bennett CJ, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res.* 2002 Apr;62(8):2220–6.
141. Zha S, Ferdinandusse S, Hicks JL, Denis S, Dunn TA, Wanders RJ, et al. Peroxisomal branched chain fatty acid beta-oxidation pathway is upregulated in prostate cancer. *Prostate.* 2005 Jun;63(4):316–23.
142. Xu J, Stolk JA, Zhang X, Silva SJ, Houghton RL, Matsumura M, et al. Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. *Cancer Res.* 2000 Mar;60(6):1677–82.
143. Jiang Z, Wu CL, Woda BA, Iczkowski KA, Chu PG, Tretiakova MS, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a multi-institutional study of a new prostate cancer marker. *Histopathology.* 2004 Sep;45(3):218–25.
144. Schostak M, Miller K, Krause H, Schrader M, Kempkensteffen C, Kollermann J. Kinetic fluorescence reverse transcriptase-polymerase chain reaction for alpha-methylacyl CoA racemase distinguishes prostate cancer from benign lesions. *Cancer Detect Prev.* 2006;30(5):449–54.
145. Zhou M, Aydin H, Kanane H, Epstein JI. How often does alpha-methylacyl-CoA-racemase contribute to resolving an atypical diagnosis on prostate needle biopsy beyond that provided by basal cell markers? *Am J Surg*

- Pathol. 2004 Feb;28(2):239–43.
146. Jiang N, Zhu S, Chen J, Niu Y, Zhou L. A-methylacyl-CoA racemase (AMACR) and prostate-cancer risk: a meta-analysis of 4,385 participants. *PLoS One*. 2013;8(10):e74386.
147. Jiang N, Zhu S, Chen J, Niu Y, Zhou L. Correction: A-Methylacyl-CoA Racemase (AMACR) and Prostate-Cancer Risk: A Meta-Analysis of 4,385 Participants. *PLoS One*. 2013;8(12).
148. Kuroda N. Application of combined immunohistochemical panel of AMACR(P504S)/p63 cocktail, cytokeratin 5 and D2-40 to atypical glands in prostatic needle biopsy. *Malays J Pathol*. 2014;36(3):169–73.
149. Zhang L, Shao N, Yu Q, Hua L, Mi Y, Feng N. Association between p53 Pro72Arg polymorphism and prostate cancer risk: a meta-analysis. *J Biomed Res*. 2011;25(1):25–32.
150. Chang F, Syrjanen S, Kurvinen K, Syrjanen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterol*. 1993 Feb;88(2):174–86.
151. Wang Y, Zhang YX, Kong CZ, Zhang Z, Zhu YY. Loss of P53 facilitates invasion and metastasis of prostate cancer cells. *Mol Cell Biochem*. 2013 Dec;384(1–2):121–7.
152. Kluth M, Harasimowicz S, Burkhardt L, Grupp K, Krohn A, Prien K, et al. Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer. *Int J cancer*. 2014 Sep;135(6):1369–80.
153. Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Jessen B, Kollermann J, Minner S, et al.

- Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc.* 2008 Nov;21(11):1371–8.
154. Brewster SF, Oxley JD, Trivella M, Abbott CD, Gillatt DA. Preoperative p53, bcl-2, CD44 and E-cadherin immunohistochemistry as predictors of biochemical relapse after radical prostatectomy. *J Urol.* 1999 Apr;161(4):1238–43.
155. Scherr DS, Vaughan EDJ, Wei J, Chung M, Felsen D, Allbright R, et al. BCL-2 and p53 expression in clinically localized prostate cancer predicts response to external beam radiotherapy. *J Urol.* 1999 Jul;162(1):12–7.
156. Huang A, Gandour-Edwards R, Rosenthal SA, Siders DB, Deitch AD, White RW. p53 and bcl-2 immunohistochemical alterations in prostate cancer treated with radiation therapy. *Urology.* 1998 Feb;51(2):346–51.
157. Lin J-T, Wang J-S, Jiann B-P, Yu C-C, Tsai J-Y, Huang J-K, et al. Correlation of p53 protein accumulation and Bcl-2 overexpression with histopathological features in prostatic cancer. *J Formos Med Assoc.* 2005 Nov;104(11):864–7.
158. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. *Introducción a la Biología Celular.* 3ª. México, D.F.: Editorial Médica Panamericana; 2011.
159. Allen JM, Bloom SR. Neuropeptides in the brain. *Brain Dev.* 1985;7(6):568–72.
160. Revelos K, Petraki C, Gregorakis A, Scorilas A, Papanastasiou P,

- Koutsilieris M. Immunohistochemical expression of Bcl2 is an independent predictor of time-to-biochemical failure in patients with clinically localized prostate cancer following radical prostatectomy. *Anticancer Res.* 2005;25(4):3123–33.
161. Di Cristofano A, De Acetis M, Koff A, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nat Genet.* 2001 Feb;27(2):222–4.
162. Wei F, Xu J, Tang L, Shao J, Wang Y, Chen L, et al. p27(Kip1) V109G polymorphism and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Biother Radiopharm.* 2012 Dec;27(10):665–71.
163. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras de cáncer en España [Internet]. Madrid: SEOM; 2018. 24 p. Available from: <http://www.seom.es>
164. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Rojas D, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol.* 2017;19(7):799–825.
165. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer* [Internet]. 2018 Aug; Available from: https://www.clinicalkey.es/service/content/pdf/watermarked/1-s2.0-S0959804918309559.pdf?locale=es_ES
166. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* [Internet].

- 2013;49(6):1374–403. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804913000075>
167. Larrañaga N, Galceran J, Ardanaz E, Franch P, Navarro C, Sanchez MJ, et al. Prostate cancer incidence trends in Spain before and during the prostate-specific antigen era: impact on mortality. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2010 May;21 Suppl 3:iii83-89.
168. Bray F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Zanetti R, et al. *Cancer Incidence in Five Continents, Vol. XI (electronic version)*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017.
169. Zhen JT, Syed J, Nguyen KA, Leapman MS, Agarwal N, Brierley K, et al. Genetic testing for hereditary prostate cancer: Current status and limitations. *Cancer*. 2018 Aug;124(15):3105–17.
170. Naslund-Koch C, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Increased Risk for Other Cancers in Addition to Breast Cancer for CHEK2*1100delC Heterozygotes Estimated From the Copenhagen General Population Study. *J Clin Oncol*. 2016 Apr;34(11):1208–16.
171. Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R, et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet*. 2002 May;31(1):55–9.
172. Malik SS, Batool R, Masood N, Yasmin A. Risk factors for prostate cancer: A multifactorial case-control study. *Curr Probl Cancer*. 2018 May;42(3):337–43.

173. Caviedes-Bucheli J, Muñoz HR, Azuero-Holguín MM, Ulate E. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. *J Endod.* 2008/06/24. 2008;34(7):773–88.
174. Muñoz M, Coveñas R, Esteban F, Redondo M. The substance P/NK-1 receptor system: NK-1 receptor antagonists as anti-cancer drugs. *J Biosci.* 2015/05/13. 2015;40(2):441–63.
175. Moons KGM, Altman DG, Reitsma JB, Collins GS. New Guideline for the Reporting of Studies Developing, Validating, or Updating a Multivariable Clinical Prediction Model: The TRIPOD Statement. *Adv Anat Pathol.* 2015 Sep;22(5):303–5.
176. Zhang H, Cang C-L, Kawasaki Y, Liang L-L, Zhang Y-Q, Ji R-R, et al. Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKCepsilon: a novel pathway for heat hyperalgesia. *J Neurosci.* 2007 Oct;27(44):12067–77.
177. Navarro G, Franco N, Martinez-Pinilla E, Franco R. The Epigenetic Cytocrin Pathway to the Nucleus. Epigenetic Factors, Epigenetic Mediators, and Epigenetic Traits. A Biochemist Perspective. *Front Genet.* 2017;8:179.
178. Radulescu RT. The nucleocrine pathway comes of age. *Rom J Morphol Embryol = Rev Roum Morphol Embryol.* 2015;56(2):343–8.
179. Radulescu RT. From insulin, retinoblastoma protein and the insulin receptor to a new model on growth factor specificity: the nucleocrine pathway. *J Endocrinol.* 1995 Sep;146(3):365–8.
180. Bubak AN, Como CN, Blackmon AM, Fietze S, Mescher T, Jones D, et al.

- Varicella Zoster Virus Induces Nuclear Translocation of the Neurokinin-1 Receptor, Promoting Lamellipodia Formation and Viral Spread in Spinal Astrocytes. *J Infect Dis.* 2018 May;
181. De Felipe J. Sesquicentenary of the birthday of Santiago Ramon y Cajal, the father of modern neuroscience. *Trends Neurosci.* 2002 Sep;25(9):481–4.
182. Ceballos M. Péptidos y neurotransmisores. In: Andreu D, Rivas L, editors. *Péptidos en Biología y Biomedicina.* Madrid, España: Consejo Superior de Investigaciones científicas, CSIC; 1997. p. 463–78.
183. Pernow B. Substance P. *Pharmacol Rev.* 1983 Jun;35(2):85–141.
184. Ehrenpreis T, Pernow B. On the occurrence of substance P in the rectosigmoid in Hirschsprung's disease. *Acta Physiol Scand.* 1953 Feb;27(4):380–8.
185. Lembeck F. The archeology of substance P. *Neuropeptides.* 2008 Aug;42(4):444–53.
186. Lembeck F. [Central transmission of afferent impulses. III. Incidence and significance of the substance P in the dorsal roots of the spinal cord]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol.* 1953;219(3):197–213.
187. Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nat New Biol.* 1971 Jul;232(29):86–7.
188. Tregear GW, Niall HD, Potts JTJ, Leeman SE, Chang MM. Synthesis of substance P. *Nat New Biol.* 1971 Jul;232(29):87–9.

189. Powell D, Leeman S, Tregear GW, Niall HD, Potts JTJ. Radioimmunoassay for substance P. *Nat New Biol.* 1973 Feb;241(112):252–4.
190. Allott EH, Masko EM, Freedland SJ. Obesity and Prostate Cancer: Weighing the Evidence. *Eur Urol [Internet].* 2013;63(5):800–9. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0302283812013449>
191. Almeida TA, Rojo J, Nieto PM, Pinto FM, Hernandez M, Martin JD, et al. Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr Med Chem.* 2004;11(15):2045–81.
192. Al-Sukhni E, Milot L, Fruitman M, Beyene J, Victor JC, Schmocker S, et al. Diagnostic accuracy of MRI for assessment of T category, lymph node metastases, and circumferential resection margin involvement in patients with rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg Oncol.* 2012 Jul;19(7):2212–23.
193. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershewald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. Vol. 67, CA: a cancer journal for clinicians. 2017. p. 93–9.
194. Arciszewski MB. Distribution of calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P (SP) and galanin (GAL) immunoreactive nerve fibers in the seminal vesicle and prostate of the male sheep. *Ann Anat.* 2004/03/05. 2004;186(1):83–7.

195. Arciszewski MB, Mozel S, Sienkiewicz W. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-27 (PACAP-27) is co-stored with galanin, substance P and corticotropin releasing factor (CRF) in intrapancreatic ganglia of the sheep. *Pol J Vet Sci.* 2015/07/15. 2015;18(2):343–50.
196. Arsenescu R, Blum AM, Metwali A, Elliott DE, Weinstock J V. IL-12 induction of mRNA encoding substance P in murine macrophages from the spleen and sites of inflammation. *J Immunol.* 2005;174(7):3906–11.
197. Ayala GE, Wheeler TM, Shine HD, Schmelz M, Frolov A, Chakraborty S, et al. In vitro dorsal root ganglia and human prostate cell line interaction: redefining perineural invasion in prostate cancer. *Prostate.* 2001 Nov;49(3):213–23.
198. Ayala GE, Dai H, Ittmann M, Li R, Powell M, Frolov A, et al. Growth and survival mechanisms associated with perineural invasion in prostate cancer. *Cancer Res.* 2004 Sep;64(17):6082–90.
199. Ayala GE, Dai H, Powell M, Li R, Ding Y, Wheeler TM, et al. Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Dec;14(23):7593–603.
200. Ayala GE, Dai H, Tahir SA, Li R, Timme T, Ittmann M, et al. Stromal antiapoptotic paracrine loop in perineural invasion of prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 2006 May;66(10):5159–64.
201. Cuello AC, Kanazawa I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* [Internet]. 1978;178(1):129–56. Available from:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cne.901780108>

202. Albrecht M, Doroszewicz J, Gillen S, Gomes I, Wilhelm B, Stief T, et al. Proliferation of prostate cancer cells and activity of neutral endopeptidase is regulated by bombesin and IL-1beta with IL-1beta acting as a modulator of cellular differentiation. *Prostate*. 2003/12/16. 2004;58(1):82–94.
203. Kangawa K, Minamino N, Fukuda A, Matsuo H. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983 Jul;114(2):533–40.
204. Nawa H, Doteuchi M, Igano K, Inouye K, Nakanishi S. Substance K: a novel mammalian tachykinin that differs from substance P in its pharmacological profile. *Life Sci*. 1984 Mar;34(12):1153–60.
205. Kimura S, Goto K, Ogawa T, Sugita Y, Kanazawa I. Pharmacological characterization of novel mammalian tachykinins, neurokinin alpha and neurokinin beta. *Neurosci Res*. 1984 Dec;2(1–2):97–104.
206. Kanazawa I, Ogawa T, Kimura S, Munekata E. Regional distribution of substance P, neurokinin alpha and neurokinin beta in rat central nervous system. *Neurosci Res*. 1984 Dec;2(1–2):111–20.
207. Lang S, Sperk G. Neurochemical characterization of preprotachykinin B(50-79) immunoreactivity in the rat. *Regul Pept*. 1995 May;57(2):183–92.
208. Maggi CA, Meli A. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen Pharmacol*. 1988;19(1):1–43.
209. Otsuka M, Konishi S. Substance P and excitatory transmitter of primary sensory neurons. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1976;40:135–43.

210. Regoli D, Boudon A, Fauchere JL. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev.* 1994 Dec;46(4):551–99.
211. Traurig H, Saria A, Lembeck F. Substance P in primary afferent neurons of the female rat reproductive system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1984 Jul;326(4):343–6.
212. Harmar AJ. Three tachykinins in mammalian brain. *Trends Neurosci* [Internet]. 1984;7(3):57–60. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016622368480154X>
213. Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience.* 1988 Mar;24(3):739–68.
214. Maggi CA, Santicioli P, Meli A. Evidence for the involvement of endogenous substance P in the motor effects of capsaicin on the rat urinary bladder. *J Pharm Pharmacol.* 1985 Mar;37(3):203–4.
215. Lundberg JM. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev.* 1996 Mar;48(1):113–78.
216. Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol.* 1997 Dec;159(11):5654–60.
217. Lai JP, Douglas SD, Ho WZ. Human lymphocytes express substance P

- and its receptor. *J Neuroimmunol.* 1998 Jun;86(1):80–6.
218. Pinto FM, Cintado CG, Devillier P, Candenas ML. Expression of preprotachykinin-B, the gene that encodes neurokinin B, in the rat uterus. *Eur J Pharmacol.* 2001 Aug;425(2):R1-2.
219. Chiwakata C, Brackmann B, Hunt N, Davidoff M, Schulze W, Ivell R. Tachykinin (substance-P) gene expression in Leydig cells of the human and mouse testis. *Endocrinology.* 1991 May;128(5):2441–8.
220. Aliakbari J, Sreedharan SP, Turck CW, Goetzl EJ. Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. *Biochem Biophys Res Commun [Internet].* 1987 Nov;148(3):1440–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X87802930?via%3Dihub>
221. Kurtz MM, Wang R, Clements MK, Cascieri MA, Austin CP, Cunningham BR, et al. Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene.* 2002;296(1–2):205–12.
222. Linnik MD, Moskowitz MA. Identification of immunoreactive substance P in human and other mammalian endothelial cells. *Peptides.* 1989;10(5):957–62.
223. Zhang Y, Lu L, Furlonger C, Wu GE, Paige CJ. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat Immunol.* 2000 Nov;1(5):392–7.
224. Tatemoto K, Lundberg JM, Jornvall H, Mutt V. Neuropeptide K: isolation,

- structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985 Apr;128(2):947–53.
225. Barbariga M, Fonteyne P, Ostadreza M, Bignami F, Rama P, Ferrari G. Substance P Modulation of Human and Murine Corneal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2018 Mar 20;59(3):1305–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.17-23198>
226. Hokfelt T, Lundberg JM, Schultzberg M, Johansson O, Skirboll L, Anggard A, et al. Cellular localization of peptides in neural structures. *Proc R Soc London Ser B, Biol Sci.* 1980 Oct;210(1178):63–77.
227. Costa M, Cuello AC, Furness JB, Franco R. Distribution of enteric neurons showing immunoreactivity for substance P in the guinea-pig ileum. *Neuroscience.* 1980;5(2):323–31.
228. Mancillas JR, McGinty JF, Selverston AI, Karten H, Bloom FE. Immunocytochemical localization of enkephalin and substance P in retina and eyestalk neurones of lobster. *Nature.* 1981 Oct;293(5833):576–8.
229. Pernow B. Substance P. *Pharmacol Rev.* 1983 Jun;35(2):85–141.
230. Zimmer G, Rohn M, McGregor GP, Schemann M, Conzelmann K-K, Herrler G. Virokinin, a bioactive peptide of the tachykinin family, is released from the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus. *J Biol Chem.* 2003 Nov;278(47):46854–61.
231. Muñoz M, Pavón A, Rosso M, Salinas M V, Pérez A, Carranza A, et al. Immunolocalization of NK-1 receptor and Substance P in human normal placenta. *Placenta.* 2010/05/01. 2010;31(7):649–51.

232. Muñoz M, Carranza A, Pavón A, Anderson G, Coveñas R. Immunolocalization of substance P and NK-1 receptor in Hofbauer cells in human normal placenta. *Microsc Res Tech.* 2013/10/25. 2013;76(12):1310–3.
233. Skirboll L, Hokfelt T, Rehfeld J, Cuello AC, Dockray G. Coexistence of substance P- and cholecystinin-like immunoreactivity in neurons of the mesencephalic periaqueductal central gray. *Neurosci Lett.* 1982;28(1):35–9.
234. Mantyh PW, Hunt SP, Maggio JE. Substance P receptors: localization by light microscopic autoradiography in rat brain using [3H]SP as the radioligand. *Brain Res.* 1984 Jul;307(1–2):147–65.
235. Cuello AC, Jessell TM, Kanazawa I, Iversen LL. Substance P: localization in synaptic vesicles in rat central nervous system. *J Neurochem.* 1977 Oct;29(4):747–51.
236. Henry JL. Substance P and inflammatory pain: potential of substance P antagonists as analgesics. *Agents Actions Suppl.* 1993;41:75–87.
237. Camras CB, Bito LZ. The pathophysiological effects of nitrogen mustard on the rabbit eye. II. The inhibition of the initial hypertensive phase by capsaicin and the apparent role of substance P. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1980;19(4):423–8.
238. Jiang Z, Dun NJ, Karczmar AG. Substance P: a putative sensory transmitter in mammalian autonomic ganglia. *Science.* 1982;217(4561):739–41.

239. Kessler JA, Black IB. Regulation of substance P in adult rat sympathetic ganglia. *Brain Res.* 1982 Feb;234(1):182–7.
240. Keast JR, Furness JB, Costa M. Distribution of peptide-containing neurons and endocrine cells in the rabbit gastrointestinal tract, with particular reference to the mucosa. *Cell Tissue Res.* 1987 Jun;248(3):565–77.
241. Furness JB, Papka RE, Della NG, Costa M, Eskay RL. Substance P-like immunoreactivity in nerves associated with the vascular system of guinea-pigs. *Neuroscience.* 1982 Feb;7(2):447–59.
242. Chapman RW, Hey JA, McLeod R, Minnicozzi M, Rizzo C. Tachykinins in the lungs. *Drug News Perspect.* 1998 Oct;11(8):480–9.
243. Dodd S, Boulton DW, Burrows GD, De Vane CL, Norman TR. In vitro metabolism of mirtazapine enantiomers by human cytochrome P450 enzymes. *Hum Psychopharmacol.* 2001 Oct;16(7):541–4.
244. Esteban F, Muñoz M, González-Moles MA, Rosso M. A role for substance P in cancer promotion and progression: a mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage. *Cancer Metastasis Rev.* 2006/05/09. 2006;25(1):137–45.
245. Hennig IM, Laissue JA, Horisberger U, Reubi JC. Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *Int J cancer.* 1995 Jun;61(6):786–92.
246. Palma C, Nardelli F, Manzini S, Maggi CA. Substance P activates responses correlated with tumour growth in human glioma cell lines bearing tachykinin NK1 receptors. *Br J Cancer.* 1999;79(2):236–43.

247. Muñoz M, Perez A, Rosso M, Zamarriego C, Rosso R. Antitumoral action of the neurokinin-1 receptor antagonist L-733 060 on human melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 2004/06/05. 2004;14(3):183–8.
248. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R, Montero I, González-Moles MA, Robles MJ. Neurokinin-1 receptors located in human retinoblastoma cell lines: antitumor action of its antagonist, L-732,138. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007/05/26. 2007;48(6):2775–81.
249. Esteban F, González-Moles MA, Castro D, Martín-Jaen M del M, Redondo M, Ruiz-Ávila I, et al. Expression of substance P and neurokinin-1-receptor in laryngeal cancer: linking chronic inflammation to cancer promotion and progression. *Histopathology.* 2009/02/12. 2009;54(2):258–60.
250. Feistritz C, Clausen J, Sturn DH, Djanani A, Gunsilius E, Wiedermann CJ, et al. Natural killer cell functions mediated by the neuropeptide substance P. *Regul Pept.* 2003 Nov;116(1–3):119–26.
251. Pascual DW, McGhee JR, Kiyono H, Bost KL. Neuroimmune modulation of lymphocyte function--I. Substance P enhances immunoglobulin synthesis in lipopolysaccharide activated murine splenic B cell cultures. *Int Immunol.* 1991;3(12):1223–9.
252. Payan DG, Brewster DR, Goetzl EJ. Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J Immunol.* 1983 Oct;131(4):1613–5.
253. Krause JE, Takeda Y, Hershey AD. Structure, functions, and mechanisms of substance P receptor action. *J Invest Dermatol.* 1992 Jun;98(6 Suppl):2S--7S.

254. Weinstock J V, Blum A, Walder J, Walder R. Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis mansoni produce substance P. *J Immunol.* 1988;141(3):961–6.
255. Page NM, Dakour J, Morrish DW. Gene regulation of neurokinin B and its receptor NK3 in late pregnancy and pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2006 Jul;12(7):427–33.
256. Lembeck F. The 1988 Ulf Euler Lecture. Substance P: from extract to excitement. *Acta Physiol Scand.* 1988;133(4):435–54.
257. Harrison S, Geppetti P. Substance p. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Jun;33(6):555–76.
258. Pascual DW, Bost KL, Xu-Amano J, Kiyono H, McGhee JR. The cytokine-like action of substance P upon B cell differentiation. *Reg Immunol.* 1992;4(2):100–4.
259. Calvo CF, Chavanel G, Senik A. Substance P enhances IL-2 expression in activated human T cells. *J Immunol.* 1992 Jun;148(11):3498–504.
260. Gitter BD, Regoli D, Howbert JJ, Glasebrook AL, Waters DC. Interleukin-6 secretion from human astrocytoma cells induced by substance P. *J Neuroimmunol.* 1994;51(1):101–8.
261. Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science.* 1988 Sep;241(4870):1218–21.
262. Lieb K, Fiebich BL, Berger M, Bauer J, Schulze-Osthoff K. The neuropeptide substance P activates transcription factor NF-kappa B and

- kappa B-dependent gene expression in human astrocytoma cells. *J Immunol.* 1997 Nov;159(10):4952–8.
263. Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Dolara P, Maggi CA. NK1-receptors mediate the proliferative response of human fibroblasts to tachykinins. *Br J Pharmacol.* 1990 May;100(1):11–4.
264. Seegers HC, Hood VC, Kidd BL, Cruwys SC, Walsh DA. Enhancement of angiogenesis by endogenous substance P release and neurokinin-1 receptors during neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jul;306(1):8–12.
265. Singh D, Joshi DD, Hameed M, Qian J, Gascon P, Maloof PB, et al. Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: implications for bone marrow metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(1):388–93.
266. Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. *Pharmacol Ther.* 1997;73(3):219–63.
267. Koon HW, Pothoulakis C. Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Nov;1088:23–40.
268. Grider JR. Tachykinins as transmitters of ascending contractile component of the peristaltic reflex. *Am J Physiol.* 1989 Nov;257(5 Pt 1):G709--14.
269. Mantyh CR, Pappas TN, Lapp JA, Washington MK, Neville LM, Ghilardi JR, et al. Substance P activation of enteric neurons in response to

- intraluminal Clostridium difficile toxin A in the rat ileum. Gastroenterology. 1996 Nov;111(5):1272–80.
270. Kincy-Cain T, Bost KL. Increased susceptibility of mice to Salmonella infection following in vivo treatment with the substance P antagonist, spantide II. J Immunol. 1996 Jul;157(1):255–64.
271. Koon H-W, Zhao D, Zhan Y, Moyer MP, Pothoulakis C. Substance P mediates antiapoptotic responses in human colonocytes by Akt activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb;104(6):2013–8.
272. Satheeshkumar PS, Mohan MP. Tachykinin Peptide, substance p, and its receptor have a significant role in tissue reactions induced by cytotoxic therapy. Vol. 59, Digestive diseases and sciences. 2014. p. 2600–1.
273. De Felipe C, Pinnock RD, Hunt SP. Modulation of chemotropism in the developing spinal cord by substance P. Science. 1995 Feb;267(5199):899–902.
274. Kovsca Janjatovic A, Valpotic H, Kezic D, Lackovic G, Gregorovic G, Sladoljev S, et al. Secretion of immunomodulating neuropeptides (VIP, SP) and nitric oxide synthase in porcine small intestine during postnatal development. Eur J Histochem. 2012 Sep;56(3):e30.
275. Azzolina A, Bongiovanni A, Lampiasi N. Substance P induces TNF-alpha and IL-6 production through NF kappa B in peritoneal mast cells. Biochim Biophys Acta. 2003;1643(1–3):75–83.
276. Koon H-W, Zhao D, Zhan Y, Simeonidis S, Moyer MP, Pothoulakis C. Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonic

- epithelial cells involves protein kinase Cdelta activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Sep;314(3):1393–400.
277. Simeonidis S, Castagliuolo I, Pan A, Liu J, Wang C-C, Mykoniatis A, et al. Regulation of the NK-1 receptor gene expression in human macrophage cells via an NF-kappa B site on its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Mar;100(5):2957–62.
278. Goode T, O'Connell J, Anton P, Wong H, Reeve J, O'Sullivan GC, et al. Neurokinin-1 receptor expression in inflammatory bowel disease: molecular quantitation and localisation. *Gut.* 2000 Sep;47(3):387–96.
279. Stucchi AF, Shebani KO, Leeman SE, Wang C-C, Reed KL, Fruin AB, et al. A neurokinin 1 receptor antagonist reduces an ongoing ileal pouch inflammation and the response to a subsequent inflammatory stimulus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;285(6):G1259--67.
280. Buell G, Schulz MF, Arkininstall SJ, Maury K, Missotten M, Adami N, et al. Molecular characterisation, expression and localisation of human neurokinin-3 receptor. *FEBS Lett.* 1992 Mar;299(1):90–5.
281. Huang RR, Yu H, Strader CD, Fong TM. Interaction of substance P with the second and seventh transmembrane domains of the neurokinin-1 receptor. *Biochemistry.* 1994 Mar;33(10):3007–13.
282. Zagorodnyuk V, Santicoli P, Maggi CA. Tachykinin NK1 but not NK2 receptors mediate non-cholinergic excitatory junction potentials in the circular muscle of guinea-pig colon. *Br J Pharmacol.* 1993 Oct;110(2):795–803.

283. Betancur C, Azzi M, Rostene W. Nonpeptide antagonists of neuropeptide receptors: tools for research and therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 1997 Oct;18(10):372–86.
284. Tsuchida K, Shigemoto R, Yokota Y, Nakanishi S. Tissue distribution and quantitation of the mRNAs for three rat tachykinin receptors. *Eur J Biochem.* 1990 Nov;193(3):751–7.
285. Werge TM. Identification of an epitope in the substance P receptor important for recognition of the common carboxyl-terminal tachykinin sequence. *J Biol Chem.* 1994 Sep;269(35):22054–8.
286. Macdonald SG, Dumas JJ, Boyd ND. Chemical cross-linking of the substance P (NK-1) receptor to the alpha subunits of the G proteins Gq and G11. *Biochemistry.* 1996 Mar;35(9):2909–16.
287. Gether U, Johansen TE, Snider RM, Lowe JA 3rd, Nakanishi S, Schwartz TW. Different binding epitopes on the NK1 receptor for substance P and non-peptide antagonist. *Nature.* 1993 Mar;362(6418):345–8.
288. Bobryshev Y V. Subset of cells immunopositive for neurokinin-1 receptor identified as arterial interstitial cells of Cajal in human large arteries. *Cell Tissue Res.* 2005 Jul;321(1):45–55.
289. Persson-Sjogren S, Lejon K, Holmberg D, Forsgren S. Expression of the NK-1 receptor on islet cells and invading immune cells in the non-obese diabetic mouse. *J Autoimmun.* 2005 Jun;24(4):269–79.
290. Lai J-P, Douglas SD, Wang Y-J, Ho W-Z. Real-time reverse transcription-PCR quantitation of substance P receptor (NK-1R) mRNA. *Clin Diagn Lab*

- Immunol. 2005;12(4):537–41.
291. Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol Ther.* 1997;73(3):173–217.
292. Patak E, Candenas ML, Pennefather JN, Ziccone S, Lilley A, Martin JD, et al. Tachykinins and tachykinin receptors in human uterus. *Br J Pharmacol.* 2003 Jun;139(3):523–32.
293. Payan DG, McGillis JP, Organist ML. Binding characteristics and affinity labeling of protein constituents of the human IM-9 lymphoblast receptor for substance P. *J Biol Chem.* 1986 Oct;261(30):14321–9.
294. McGillis JP, Mitsuhashi M, Payan DG. Immunomodulation by tachykinin neuropeptides. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;594:85–94.
295. Friess H, Zhu Z, Liard V, Shi X, Shrikhande S V, Wang L, et al. Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Lab Invest.* 2003/05/15. 2003;83(5):731–42.
296. Muñoz M, Rosso M, Pérez A, Coveñas R, Rosso R, Zamarriego C, et al. The NK1 receptor is involved in the antitumoural action of L-733,060 and in the mitogenic action of substance P on neuroblastoma and glioma cell lines. *Neuropeptides.* 2005/06/09. 2005;39(4):427–32.
297. Rosso M, Robles-Frias MJ, Coveñas R, Salinas-Martin M V, Muñoz M. The NK-1 receptor is expressed in human primary gastric and colon adenocarcinomas and is involved in the antitumor action of L-733,060 and the mitogenic action of substance P on human gastrointestinal cancer cell lines. *Tumour Biol.* 2008/09/11. 2008;29(4):245–54.

298. Muñoz M, Rosso M, Aguilar FJ, González-Moles MA, Redondo M, Esteban F. NK-1 receptor antagonists induce apoptosis and counteract substance P-related mitogenesis in human laryngeal cancer cell line HEP-2. *Invest New Drugs*. 2007/10/02. 2008;26(2):111–8.
299. Muñoz M, Rosso M, Carranza A, Coveñas R. Increased nuclear localization of substance P in human gastric tumor cells. *Acta Histochem*. 2017/03/23. 2017;119(3):337–42.
300. Spitsin S, Pappa V, Douglas SD. Truncation of neurokinin-1 receptor- Negative regulation of substance P signaling. *J Leukoc Biol*. 2018 Jan;
301. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. The NK-1 receptor: a new target in cancer therapy. *Curr Drug Targets*. 2011/01/14. 2011;12(6):909–21.
302. Guha S, Eibl G, Kisfalvi K, Fan RS, Burdick M, Reber H, et al. Broad-spectrum G protein-coupled receptor antagonist, [D-Arg1,D-Trp5,7,9,Leu11]SP: a dual inhibitor of growth and angiogenesis in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2005 Apr;65(7):2738–45.
303. Berger M, Neth O, Ilmer M, Garnier A, Salinas-Martín MV, de Agustín Asencio JC, et al. Hepatoblastoma cells express truncated neurokinin-1 receptor and can be growth inhibited by aprepitant in vitro and in vivo. *J Hepatol* [Internet]. 2014/01/15. 2014 May;60(5):985–94. Available from: https://ac.els-cdn.com/S016882781400004X/1-s2.0-S016882781400004X-main.pdf?_tid=b48face9-5bc8-4653-95e3-df0649b90acb&acdnat=1535126289_c3b9bb68d327300c95458e9eed7ec2ec

304. Muñoz M, Rosso M, Perez A, Coveñas R, Rosso R, Zamarriego C, et al. Antitumoral action of the neurokinin-1-receptor antagonist L-733,060 and mitogenic action of substance P on human retinoblastoma cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005/06/28. 2005;46(7):2567–70.
305. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. Neurokinin-1 Receptor Antagonists in Lung Cancer Therapy. *Lett Drug Des Discov.* 2017;14(12):1465–76.
306. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. A new frontier in the treatment of cancer: NK-1 receptor antagonists. *Curr Med Chem.* 2009/12/18. 2010;17(6):504–16.
307. Muñoz M, González-Ortega A, Coveñas R. The NK-1 receptor is expressed in human leukemia and is involved in the antitumor action of aprepitant and other NK-1 receptor antagonists on acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Invest New Drugs.* 2010/12/02. 2012;30(2):529–40.
308. Muñoz M, Gonzalez-Ortega A, Rosso M, Robles-Frias MJ, Carranza A, Salinas-Martin M V, et al. The substance P/neurokinin-1 receptor system in lung cancer: focus on the antitumor action of neurokinin-1 receptor antagonists. *Peptides.* 2012/10/03. 2012;38(2):318–25.
309. Muñoz M, González-Ortega A, Salinas-Martin M V, Carranza A, García-Recio S, Almendro V, et al. The neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant is a promising candidate for the treatment of breast cancer. *Int J Oncol.* 2014/09/02. 2014;45(4):1658–72.
310. Muñoz M, Recio S, Rosso M, Redondo M, Coveñas R. The antiproliferative action of [D-Arg(1), D-Phe(5), D-Trp(7,9), LEU(11)] substance P analogue

- antagonist against small-cell- and non-small-cell lung cancer cells could be due to the pharmacological profile of its tachykinin receptor antagonist. *J Physiol Pharmacol.* 2015/06/19. 2015;66(3):421–6.
311. Rupniak NM, Carlson E, Boyce S, Webb JK, Hill RG. Enantioselective inhibition of the formalin paw late phase by the NK1 receptor antagonist L-733,060 in gerbils. *Pain.* 1996 Sep;67(1):189–95.
312. Bang R, Biburger M, Neuhuber WL, Tiegs G. Neurokinin-1 receptor antagonists protect mice from CD95- and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptotic liver damage. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Mar;308(3):1174–80.
313. Giardina GAM, Gagliardi S, Martinelli M. Antagonists at the neurokinin receptors--recent patent literature. *IDrugs.* 2003;6(8):758–72.
314. Snider RM, Constantine JW, Lowe JA 3rd, Longo KP, Lebel WS, Woody HA, et al. A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK1) receptor. *Science.* 1991;251(4992):435–7.
315. Rupniak NM, Carlson EC, Harrison T, Oates B, Seward E, Owen S, et al. Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK(1)) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacology.* 2000 Jun;39(8):1413–21.
316. Kramer MS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman J, Sramek JJ, et al. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science.* 1998 Sep;281(5383):1640–5.
317. Quartara L, Maggi CA. The tachykinin NK1 receptor. Part II: Distribution

- and pathophysiological roles. *Neuropeptides*. 1998 Feb;32(1):1–49.
318. Rupniak NM, Kramer MS. Discovery of the antidepressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. *Trends Pharmacol Sci*. 1999;20(12):485–90.
319. Brener S, González-Moles MA, Tostes D, Esteban F, Gil-Montoya JA, Ruiz-Ávila I, et al. A role for the substance P/NK-1 receptor complex in cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2009/06/17. 2009;29(6):2323–9.
320. González Moles MA, Mosqueda-Taylor A, Esteban F, Gil-Montoya JA, Díaz-Franco MA, Delgado M, et al. Cell proliferation associated with actions of the substance P/NK-1 receptor complex in keratocystic odontogenic tumours. *Oral Oncol*. 2008/05/20. 2008;44(12):1127–33.
321. Muñoz M, Coveñas R. NK-1 receptor antagonists: a new generation of anticancer drugs. *Mini Rev Med Chem*. 2012/04/20. 2012;12(7):593–9.
322. Muñoz M, Coveñas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2014/03/08. 2014;20(9):2321–34.
323. Koh Y-H, Tamizhselvi R, Bhatia M. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH2-terminal kinase, through nuclear factor-kappaB and activator protein-1, contribute to caerulein-induced expression of substance P and neurokinin-1 receptors in pancreatic acinar cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Mar;332(3):940–8.
324. Walczak-Drzewiecka A, Ratajewski M, Wagner W, Dastyk J. HIF-1alpha

- is up-regulated in activated mast cells by a process that involves calcineurin and NFAT. *J Immunol.* 2008;181(3):1665–72.
325. Ashida S, Kawada C, Inoue K. Stromal regulation of prostate cancer cell growth by mevalonate pathway enzymes HMGCS1 and HMGCR. *Oncol Lett* [Internet]. 2017 Dec;14(6):6533–42. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5686443/pdf/ol-14-06-6533.pdf>
326. Shiao SL, Chu GC-Y, Chung LWK. Regulation of prostate cancer progression by the tumor microenvironment. *Cancer Lett* [Internet]. 2016;380(1):340–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383515007739>
327. Feng F, Yang J, Tong L, Yuan S, Tian Y, Hong L, et al. Substance P immunoreactive nerve fibres are related to gastric cancer differentiation status and could promote proliferation and migration of gastric cancer cells. *Cell Biol Int.* 2010/11/26. 2011;35(6):623–9.
328. Meshki J, Douglas SD, Lai J-PP, Schwartz L, Kilpatrick LE, Tuluc F. Neurokinin 1 receptor mediates membrane blebbing in HEK293 cells through a Rho/Rho-associated coiled-coil kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2009/01/31. 2009;284(14):9280–9.
329. Zhou Y, Zhao L, Xiong T, Chen X, Zhang Y, Yu M, et al. Roles of full-length and truncated neurokinin-1 receptors on tumor progression and distant metastasis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013/06/29. 2013;140(1):49–61.

330. Liu B, Lu K-Y. Neural invasion in pancreatic carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2002;1(3):469–76.
331. Hirai I, Kimura W, Ozawa K, Kudo S, Suto K, Kuzu H, et al. Perineural invasion in pancreatic cancer. *Pancreas.* 2002;24(1):15–25.
332. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer.* 2009 Aug;115(15):3379–91.
333. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Nov;27(31):5131–7.
334. Ceyhan GO, Demir IE, Altintas B, Rauch U, Thiel G, Muller MW, et al. Neural invasion in pancreatic cancer: a mutual tropism between neurons and cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Sep;374(3):442–7.
335. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients. *J Clin Oncol.* 2015 Jun;33(16):1787–96.
336. Munoz M, Rosso M, Robles-Frias MJ, Salinas-Martin M V, Rosso R, Gonzalez-Ortega A, et al. The NK-1 receptor is expressed in human melanoma and is involved in the antitumor action of the NK-1 receptor antagonist aprepitant on melanoma cell lines. *Lab Invest.* 2010/05/12. 2010;90(8):1259–69.
337. Lang K, th Drell TL, Lindecke A, Niggemann B, Kaltschmidt C, Zaenker KS, et al. Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters

- and its pharmacological inhibition by established drugs. *Int J Cancer*. 2004/09/08. 2004;112(2):231–8.
338. Schaid DJ. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Hum Mol Genet*. 2004 Apr;13 Spec No:R103-21.
339. Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limon P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat Rev Immunol*. 2010 Aug;10(8):554–67.
340. Carolan EJ, Casale TB. Effects of neuropeptides on neutrophil migration through noncellular and endothelial barriers. *J Allergy Clin Immunol*. 1993 Oct;92(4):589–98.
341. Tominaga K, Honda K, Akahoshi A, Makino Y, Kawarabayashi T, Takano Y, et al. Substance P causes adhesion of neutrophils to endothelial cells via protein kinase C. *Biol Pharm Bull*. 1999 Nov;22(11):1242–5.
342. Chiwakata CB, Hort G, Hemmer CJ, Dietrich M. Sera from patients with falciparum malaria induce substance P gene expression in cultured human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun*. 1996 Dec;64(12):5106–10.
343. Quinlan KL, Naik SM, Cannon G, Armstrong CA, Bunnett NW, Ansel JC, et al. Substance P activates coincident NF-AT- and NF-kappa B-dependent adhesion molecule gene expression in microvascular endothelial cells through intracellular calcium mobilization. *J Immunol*. 1999 Nov;163(10):5656–65.
344. Smith CH, Barker JN, Morris RW, MacDonald DM, Lee TH. Neuropeptides

- induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. *J Immunol.* 1993 Sep;151(6):3274–82.
345. Bronte V, Kasic T, Gri G, Gallana K, Borsellino G, Marigo I, et al. Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J Exp Med.* 2005 Apr;201(8):1257–68.
346. Lin D, Wang X, Choi SYC, Ci X, Dong X, Wang Y. Immune phenotypes of prostate cancer cells: Evidence of epithelial immune cell-like transition? *Asian J Urol* [Internet]. 2016;3(4):195–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajur.2016.08.002>
347. Walsh DA, Hu DE, Mapp PI, Polak JM, Blake DR, Fan TP. Innervation and neurokinin receptors during angiogenesis in the rat sponge granuloma. *Histochem J.* 1996 Nov;28(11):759–69.
348. Esposito I, Menicagli M, Funel N, Bergmann F, Boggi U, Mosca F, et al. Inflammatory cells contribute to the generation of an angiogenic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol.* 2004 Jun;57(6):630–6.
349. Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, Fingleton B, Green-Jarvis B, Shyr Y, et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell.* 2004 Oct;6(4):409–21.
350. de Visser KE, Coussens LM. The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. *Contrib Microbiol.* 2006;13:118–37.

351. Meng Y, Liao Y-B, Xu P, Wei W-R, Wang J. Perineural invasion is an independent predictor of biochemical recurrence of prostate cancer after local treatment: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(8):13267–74.
352. Vargas SO, Jiroutek M, Welch WR, Nucci MR, D'Amico A V, Renshaw AA. Perineural invasion in prostate needle biopsy specimens. Correlation with extraprostatic extension at resection. *Am J Clin Pathol*. 1999 Feb;111(2):223–8.
353. D'Amico A V, Wu Y, Chen MH, Nash M, Renshaw AA, Richie JP. Perineural invasion as a predictor of biochemical outcome following radical prostatectomy for select men with clinically localized prostate cancer. *J Urol*. 2001 Jan;165(1):126–9.
354. Feng FY, Qian Y, Stenmark MH, Halverson S, Blas K, Vance S, et al. Perineural invasion predicts increased recurrence, metastasis, and death from prostate cancer following treatment with dose-escalated radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011 Nov;81(4):e361-7.
355. DeLancey JO, Wood DPJ, He C, Montgomery JS, Weizer AZ, Miller DC, et al. Evidence of perineural invasion on prostate biopsy specimen and survival after radical prostatectomy. *Urology*. 2013 Feb;81(2):354–7.
356. Katz B, Srougi M, Dall'Oglio M, Nesrallah AJ, Sant'anna AC, Pontes JJ, et al. Perineural invasion detection in prostate biopsy is related to recurrence-free survival in patients submitted to radical prostatectomy. *Urol Oncol*. 2013 Feb;31(2):175–9.
357. Gadia R, Teixeira Leite ET, Bierrenbach AL, Ynoe de Moraes F, Spratt DE,

- Arruda FF, et al. Long-term outcomes of dose-escalated intensity modulated radiation therapy alone without androgen deprivation therapy for patients with intermediate and high-risk prostate cancer. *Adv Radiat Oncol.* 2016;1(4):300–9.
358. Sun G, Huang R, Zhang X, Shen P, Gong J, Zhao J, et al. The impact of multifocal perineural invasion on biochemical recurrence and timing of adjuvant androgen-deprivation therapy in high-risk prostate cancer following radical prostatectomy. *Prostate.* 2017 Sep;77(12):1279–87.
359. Zareba P, Flavin R, Isikbay M, Rider JR, Gerke TA, Finn S, et al. Perineural Invasion and Risk of Lethal Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017 May;26(5):719–26.
360. de la Taille A, Rubin MA, Bagiella E, Olsson CA, Buttyan R, Burchardt T, et al. Can perineural invasion on prostate needle biopsy predict prostate specific antigen recurrence after radical prostatectomy? *J Urol.* 1999 Jul;162(1):103–6.
361. de la Taille A, Katz A, Bagiella E, Olsson CA, O'Toole KM, Rubin MA. Perineural invasion on prostate needle biopsy: an independent predictor of final pathologic stage. *Urology.* 1999 Dec;54(6):1039–43.
362. Bonin SR, Hanlon AL, Lee WR, Movsas B, al-Saleem TI, Hanks GE. Evidence of increased failure in the treatment of prostate carcinoma patients who have perineural invasion treated with three-dimensional conformal radiation therapy. *Cancer.* 1997 Jan;79(1):75–80.
363. Anderson PR, Hanlon AL, Patchefsky A, Al-Saleem T, Hanks GE.

- Perineural invasion and Gleason 7-10 tumors predict increased failure in prostate cancer patients with pretreatment PSA <10 ng/ml treated with conformal external beam radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998 Jul;41(5):1087–92.
364. D'Amico A V. Perineural invasion as a predictor of PSA outcome following local therapy for patients with clinically localized prostate cancer. *Cancer J.* 2001;7(5):375–6.
365. Beard CJ, Chen MH, Cote K, Loffredo M, Renshaw AA, Hurwitz M, et al. Perineural invasion is associated with increased relapse after external beam radiotherapy for men with low-risk prostate cancer and may be a marker for occult, high-grade cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Jan;58(1):19–24.
366. Beard C, Schultz D, Loffredo M, Cote K, Renshaw AA, Hurwitz MD, et al. Perineural invasion associated with increased cancer-specific mortality after external beam radiation therapy for men with low- and intermediate-risk prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 Oct;66(2):403–7.
367. Kuang AG, Nickel JC, Andriole GL, Castro-Santamaria R, Freedland SJ, Moreira DM. Both acute and chronic inflammation are associated with less perineural invasion in men with prostate cancer on repeat biopsy. *BJU Int.* 2018 Jun;
368. Moreira DM, Fleshner NE, Freedland SJ. Baseline Perineural Invasion is Associated with Shorter Time to Progression in Men with Prostate Cancer Undergoing Active Surveillance: Results from the REDEEM Study. *J Urol.*

- 2015 Nov;194(5):1258–63.
369. Quinn LM, Hollis AC, Hodson J, Elshafie MA, Hallissey MT, Whiting JL, et al. Prognostic significance of circumferential resection margin involvement in patients receiving potentially curative treatment for oesophageal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2018 Aug;44(8):1268–77.
370. Lee IH, Roberts R, Shah RB, Wojno KJ, Wei JT, Sandler HM. Perineural invasion is a marker for pathologically advanced disease in localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Jul;68(4):1059–64.
371. Yu H-HM, Song DY, Tsai Y-Y, Thompson T, Frassica DA, DeWeese TL. Perineural invasion affects biochemical recurrence-free survival in patients with prostate cancer treated with definitive external beam radiotherapy. *Urology*. 2007 Jul;70(1):111–6.
372. Wong WW, Schild SE, Vora SA, Halyard MY. Association of percent positive prostate biopsies and perineural invasion with biochemical outcome after external beam radiotherapy for localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004 Sep;60(1):24–9.
373. Al-Hussain T, Carter HB, Epstein JI. Significance of prostate adenocarcinoma perineural invasion on biopsy in patients who are otherwise candidates for active surveillance. *J Urol*. 2011 Aug;186(2):470–3.
374. Peng LC, Narang AK, Gergis C, Radwan NA, Han P, Marciscano AE, et al. Effects of perineural invasion on biochemical recurrence and prostate cancer-specific survival in patients treated with definitive external beam

- radiotherapy. *Urol Oncol.* 2018 Jun;36(6):309.e7-309.e14.
375. Li X, Ma G, Ma Q, Li W, Liu J, Han L, et al. Neurotransmitter substance P mediates pancreatic cancer perineural invasion via NK-1R in cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2013/01/25. 2013 Mar;11(3):294–302.
376. Lubig S, Thiesler T, Muller S, Vorreuther R, Leipner N, Kristiansen G. Quantitative perineural invasion is a prognostic marker in prostate cancer. *Pathology.* 2018 Apr;50(3):298–304.
377. Mei G, Xia L, Zhou J, Zhang Y, Tuo Y, Fu S, et al. Neuropeptide SP activates the WNT signal transduction pathway and enhances the proliferation of bone marrow stromal stem cells. *Cell Biol Int.* 2013 Nov;37(11):1225–32.
378. Fu S, Mei G, Wang Z, Zou Z-L, Liu S, Pei G-X, et al. Neuropeptide substance P improves osteoblastic and angiogenic differentiation capacity of bone marrow stem cells in vitro. *Biomed Res Int.* 2014;2014:596023.
379. Wang L, Shi X, Zhao R, Halloran BP, Clark DJ, Jacobs CR, et al. Calcitonin-gene-related peptide stimulates stromal cell osteogenic differentiation and inhibits RANKL induced NF-kappaB activation, osteoclastogenesis and bone resorption. *Bone.* 2010 May;46(5):1369–79.
380. Rameshwar P, Poddar A, Zhu G, Gascon P. Receptor induction regulates the synergistic effects of substance P with IL-1 and platelet-derived growth factor on the proliferation of bone marrow fibroblasts. *J Immunol.* 1997 Apr;158(7):3417–24.
381. Castro TA, Cohen MC, Rameshwar P. The expression of neurokinin-1 and

- preprotachykinin-1 in breast cancer cells depends on the relative degree of invasive and metastatic potential. *Clin Exp Metastasis*. 2005;22(8):621–8.
382. Oh HS, Moharita A, Potian JG, Whitehead IP, Livingston JC, Castro TA, et al. Bone marrow stroma influences transforming growth factor-beta production in breast cancer cells to regulate c-myc activation of the preprotachykinin-I gene in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2004 Sep;64(17):6327–36.
383. Rao G, Patel PS, Idler SP, Maloof P, Gascon P, Potian JA, et al. Facilitating role of preprotachykinin-I gene in the integration of breast cancer cells within the stromal compartment of the bone marrow: a model of early cancer progression. *Cancer Res*. 2004 Apr;64(8):2874–81.
384. Chen X-Y, Ru G-Q, Ma Y-Y, Xie J, Chen W-Y, Wang H-J, et al. High expression of substance P and its receptor neurokinin-1 receptor in colorectal cancer is associated with tumor progression and prognosis. *Onco Targets Ther*. 2016;9:3595–602.
385. Hepler JR. G protein coupled receptor signaling complexes in live cells. *Cell Logist*. 2014;4:e29392.
386. Clapham DE, Neer EJ. New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature*. 1993 Sep;365(6445):403–6.
387. Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*. 1997 Nov;390(6655):88–91.
388. Della Rocca GJ, van Biesen T, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM, Lefkowitz

- RJ. Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *J Biol Chem.* 1997 Aug;272(31):19125–32.
389. van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE, Lefkowitz RJ. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.* 1996 Dec;17(6):698–714.
390. Vogler O, Nolte B, Voss M, Schmidt M, Jakobs KH, van Koppen CJ. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration and function by beta-arrestin. *J Biol Chem.* 1999;274(18):12333–8.
391. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, et al. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science.* 1999;283(5402):655–61.
392. Ignatova EG, Belcheva MM, Bohn LM, Neuman MC, Coscia CJ. Requirement of receptor internalization for opioid stimulation of mitogen-activated protein kinase: biochemical and immunofluorescence confocal microscopic evidence. *J Neurosci.* 1999;19(1):56–63.
393. Fowler CJ, Brannstrom G. Substance P enhances forskolin-stimulated cyclic AMP production in human UC11MG astrocytoma cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1994;16(1):21–8.
394. Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, et al. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature.* 1993 Oct;365(6447):649–51.
395. Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A. Signal

- characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.* 1997;16(23):7032–44.
396. Peng L, Jia X, Zhao J, Cui R, Yan M. Substance P promotes hepatic stellate cell proliferation and activation via the TGF-beta1/Smad-3 signaling pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017 Aug;329:293–300.
397. Suvas S. Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis. *J Immunol.* 2017 Sep;199(5):1543–52.
398. Shafiq M, Zhang Q, Zhi D, Wang K, Kong D, Kim D-H, et al. In Situ Blood Vessel Regeneration Using SP (Substance P) and SDF (Stromal Cell-Derived Factor)-1alpha Peptide Eluting Vascular Grafts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018 Jul;38(7):e117–34.
399. Muñoz M, Pérez A, Coveñas R, Rosso M, Castro E. Antitumoural action of L-733,060 on neuroblastoma and glioma cell lines. *Arch Ital Biol.* 2004/07/14. 2004;142(2):105–12.
400. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature.* 2005;436(7051):642.
401. Bulavin D V, Demidov ON, Saito S, Kauraniemi P, Phillips C, Amundson SA, et al. Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat Genet.* 2002 Jun;31(2):210–5.
402. Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol.* 2000 May;35(3):317–29.
403. Ferbeyre G, de Stanchina E, Lin AW, Querido E, McCurrach ME, Hannon

- GJ, et al. Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol.* 2002 May;22(10):3497–508.
404. Lin AW, Lowe SW. Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(9):5025–30.
405. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 1997 Mar;88(5):593–602.
406. Ding H-F, Fisher DE. Induction of apoptosis in cancer: new therapeutic opportunities. *Ann Med.* 2002;34(6):451–69.
407. Wan Y, Meng F, Wu N, Zhou T, Venter J, Francis H, et al. Substance P increases liver fibrosis by differential changes in senescence of cholangiocytes and hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2017/03/04. 2017;66(2):528–41.
408. Ding YQ, Shigemoto R, Takada M, Ohishi H, Nakanishi S, Mizuno N. Localization of the neuromedin K receptor (NK3) in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol.* 1996/01/08. 1996;364(2):290–310.
409. Castro-Obregon S, Rao R V, del Rio G, Chen SF, Poksay KS, Rabizadeh S, et al. Alternative, nonapoptotic programmed cell death: mediation by arrestin 2, ERK2, and Nur77. *J Biol Chem.* 2004;279(17):17543–53.
410. Bargmann W, Lindner E, Andres KH. Über Synapsen an endokrinen Epithelzellen und die Definition sekretorischer Neurone. *Zeitschrift für Zellforsch und Mikroskopische Anat [Internet].* 1967;77(2):282–98.

Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00340794>

411. Palma C, Bigioni M, Irrissuto C, Nardelli F, Maggi CA, Manzini S. Anti-tumour activity of tachykinin NK1 receptor antagonists on human glioma U373 MG xenograft. *Br J Cancer*. 2000 Jan;82(2):480–7.
412. Hilakivi-Clarke L, Rowland J, Clarke R, Lippman ME. Psychosocial factors in the development and progression of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1994 Feb;29(2):141–60.
413. Chujo M, Kigawa J, Okamura H. Psychological Factors and Characteristics of Recurrent Breast Cancer Patients with or without Psychosocial Group Therapy Intervention. *Yonago Acta Med*. 2011 Dec;54(4):65–74.
414. Okamura M, Yamawaki S, Akechi T, Taniguchi K, Uchitomi Y. Psychiatric disorders following first breast cancer recurrence: prevalence, associated factors and relationship to quality of life. *Jpn J Clin Oncol*. 2005 Jun;35(6):302–9.
415. Cereda V, Formica V, Roselli M. Issues and promises of bevacizumab in prostate cancer treatment. *Expert Opin Biol Ther*. 2018 Jun;18(6):707–17.
416. Mayordomo C, Garcia-Recio S, Ametller E, Fernandez-Nogueira P, Pastor-Arroyo EM, Vinyals L, et al. Targeting of substance P induces cancer cell death and decreases the steady state of EGFR and Her2. *J Cell Physiol*. 2011/05/24. 2012;227(4):1358–66.
417. Muñoz M, Rosso M. The NK-1 receptor antagonist aprepitant as a broad spectrum antitumor drug. *Invest New Drugs*. 2009/01/17. 2010;28(2):187–93.

418. Muñoz M, Berger M, Rosso M, González-Ortega A, Carranza A, Coveñas R. Antitumor activity of neurokinin-1 receptor antagonists in MG-63 human osteosarcoma xenografts. *Int J Oncol.* 2013/11/06. 2014;44(1):137–46.

Anexos

4 ANEXOS

4.1 Anexo I, Certificado de aprobación por el Comité de éticac de la Investigación de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío de Sevilla



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

Informe Dictamen Favorable
Proyecto Investigación Biomédica

C.P. Tesis_SP_CaProst - C.I. 0498-N-18

20 de abril de 2018

CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

Dr. Víctor Sánchez Margalet
Presidente del CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

CERTIFICA

1º. Que el CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío en su reunión del día 22/03/2018, acta 04/2018 ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

Título: Estudio inmunohistoquímico sobre la expresión y distribución de la sustancia P y del Receptor NK1 en la próstata humana normal y patológica (Estudio SuPress)

Código Promotor: Tesis_SP_CaProst **Código Interno:** 0498-N-18
Promotor: Investigador

1º. Considera que

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEI emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

3º. Este CEI acepta que dicho estudio sea realizado en los siguientes CEI/Centros por los Investigadores:

CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y
Virgen del Rocío

Dr. Luis Gabriel Luque Romero
(Atención Primaria) Centro de Salud Mairena
del Aljarafe

Lo que firmo en Sevilla, a 20 de abril de 2018

Fdo:

SANCHEZ
MARGALET
VICTOR
MANUEL -
28691159Q

Firmado digitalmente
por SANCHEZ
MARGALET VICTOR
MANUEL - 28691159Q
Fecha: 2018.04.20
13:46:23 +02'00'

Dr. Víctor Sánchez Margalet
Presidente del CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

4.2 Anexo II, Tabla de definición de variables

Nombre variable	Definición conceptual	Tipo variable	Naturaleza variable	Ninguna	Fuente de datos
Nid	Número de identificación				
Edad al diagnóstico (años)	Edad del individuo a la fecha del diagnóstico anatomopatológico, calculada mediante la diferencia entre la fecha del diagnóstico y la del nacimiento.	Independiente	Cuantitativa continua	Edad (años con un decimal)	Historia Clínica (DIRAYA AP/AE-Estación Clínica), TiCares, Registro Provincial del Cáncer.
Tipo de tejido	Tipo de tejido estudiado (grupo de estudio)	Independiente	Cualitativa dicotómica	Normal= 0; Tumoral= 1	Informe de anatomía patológica del HSJDA
Diagnóstico_AP	Diagnóstico histopatológico	Independiente	Cualitativa politómica	Texto libre	Informe de anatomía patológica
Exitus	Fallecimiento durante la fase de seguimiento	Dependiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	Historia Clínica (DIRAYA AP/AE-Estación Clínica), TiCares, Registro Provincial del Cáncer.
Causa de exitus	Causa del fallecimiento	Dependiente		Vivo= 0; Muerte por Ca de próstata= 1; muerte por otra causa= 2	Historia Clínica (DIRAYA AP/AE-Estación Clínica), TiCares, Registro Provincial del Cáncer.
Edad de supervivencia (años)	Edad del individuo a la fecha del exitus, calculada mediante la diferencia entre la fecha del del fallecimiento y la del diagnóstico.	Dependiente	Cuantitativa continua	Edad (años con un decimal)	Historia Clínica (DIRAYA AP/AE-Estación Clínica), TiCares, Registro Provincial del Cáncer.
Supervivencia Global específica ppor CPr (meses)	Tiempo transcurrido entre la fecha de diagnóstico clínico y 5 y/o 10 años después o la fecha de exitus por CPr	Dependiente	Cuantitativa continua	Tiempo en meses con 1 decimal	Historia Clínica (DIRAYA AP/AE-Estación Clínica), TiCares, Registro Provincial del Cáncer.

Nombre variable	Definición conceptual	Tipo variable	Naturaleza variable	Ninguna	Fuente de datos
Recidiva bioquímica	Elevación de las [PSA]pl durante la fase de seguimiento postquirúrgico (PSA \geq 0,2)	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	Historia Clínica (DIRAYA AP/AE-Estación Clínica), TiCares, Registro Provincial del Cáncer.
Metástasis	Aparición de una metástasis a distancia de adenocarcinoma protático durante la fase de seguimiento postquirúrgico	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	Historia Clínica (DIRAYA AP/AE-Estación Clínica), TiCares, Registro Provincial del Cáncer.
Localización metástasis	Localización anatómica de las metástasis	Independiente	Cualitativa politómica	No= 0; Sí= 1	Historia Clínica (DIRAYA AP/AE-Estación Clínica), TiCares, Registro Provincial del Cáncer.
Supervivencia Libre de Enfermedad (meses)	Tiempo transcurrido entre la fecha de diagnóstico clínico y la aparición de recidiva bioquímica o metástasis	Dependiente	Cuantitativa continua	Tiempo en meses con 1 decimal	Historia Clínica (DIRAYA AP/AE-Estación Clínica), TiCares, Registro Provincial del Cáncer.
Radioterapia	Se registrará si recibió algún tipo de tratamiento radioterápico	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	Historia Clínica (DIRAYA AP/AE-Estación Clínica), TiCares, Registro Provincial del Cáncer.
Patrón Gleason principal	Puntuación según la escala de Gleason en el patrón histológico predominante del tumor en la pieza de prostatectomía radical	Independiente	Cuantitativa escala	{3, Gleason 3}...	Informe de anatomía patológica del HSJDA
Patrón Gleason secundario	Puntuación según la escala de Gleason en el patrón histológico secundario del tumor en la pieza de prostatectomía radical	Independiente	Cuantitativa escala	{2, Gleason 2}...	Informe de anatomía patológica del HSJDA
Puntuación Gleason	Sumatorio de la puntuación de los dos patrones	Independiente	Cuantitativa escala	{5, 5}...	Informe de anatomía patológica del HSJDA

Nombre variable	Definición conceptual	Tipo variable	Naturaleza variable	Ninguna	Fuente de datos
Patrón de Gleason	Anotación en forma de suma de los patrones predominante y secundario del tumor	Independiente	Cualitativa politómica	{1, 5 (3+2)}...	Informe de anatomía patológica del HSJDA
	Clasificación TNM patológica	Independiente	Cualitativa politómica	Ninguna	Informe de anatomía patológica del HSJDA
Tumor (pT)	Grado de infiltración de descrito por el patólogo siguiendo los criterios de la AJCC 8th Edition	Independiente	Cualitativa politómica	pT2= 1; pT3= 2	Informe de anatomía patológica del HSJDA
Aferctación margen radial (R)	Adenopatías descritas por el patólogo siguiendo los criterios de la AJCC 8th Edition	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	Informe de anatomía patológica del HSJDA
Afectación ápex	Afectación del vértice o ápex prostático descrita por el patólogo en la hematoxilina-eosina	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	Informe de anatomía patológica del HSJDA
PSA prequirúrgico	Concentración plasmática de Antígeno prostático específico [PSA]pl obtenido antes de la prostatectomía (2009)	Independiente	Cuantitativa continua	ng/ml	Base de datos del laboratorio del HSJDA
PSA postquirúrgico	[PSA]pl obtenido entre uno y tres meses después de la prostatectomía	Independiente	Cuantitativa continua	ng/ml	Base de datos del laboratorio del HSJDA
PSA 2010	[PSA]pl obtenido en 2010	Independiente	Cuantitativa continua	ng/ml	Base de datos del laboratorio del HSJDA
PSA 2011	[PSA]pl obtenido en 2011	Independiente	Cuantitativa continua	ng/ml	Base de datos del laboratorio del HSJDA
PSA 2012	[PSA]pl obtenido en 2012	Independiente	Cuantitativa continua	ng/ml	Base de datos del laboratorio del HSJDA

Nombre variable	Definición conceptual	Tipo variable	Naturaleza variable	Ninguna	Fuente de datos
PSA 2013	[PSA]pl obtenido en 2013	Independiente	Cuantitativa continua	ng/ml	Base de datos del laboratorio del HSJDA
PSA 2014	[PSA]pl obtenido en 2014	Independiente	Cuantitativa continua	ng/ml	Base de datos del laboratorio del HSJDA
PSA 2015	[PSA]pl obtenido en 2015	Independiente	Cuantitativa continua	ng/ml	Base de datos del laboratorio del HSJDA
PSA 2016	[PSA]pl obtenido en 2016	Independiente	Cuantitativa continua	ng/ml	Base de datos del laboratorio del HSJDA
PSA 2017	[PSA]pl obtenido en 2017	Independiente	Cuantitativa continua	ng/ml	Base de datos del laboratorio del HSJDA
PSA 2018	[PSA]pl obtenido en 2018	Independiente	Cuantitativa continua	ng/ml	Base de datos del laboratorio del HSJDA
Expresión IHQ Bcl2	Expresión inmunohistoquímica del oncogen Bcl2	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	Nominal
Expresión IHQ p53	Expresión inmunohistoquímica del gen supresor p53	Independiente	Cualitativa politómica	Nula= 0; Débil= 1; Moderada-Intermedia= 2; Fuerte= 3	Nominal
SP Intensidad citoplasma	Intensidad de la tinción inmunohistoquímica a nivel del citoplasma de las células tumorales con anticuerpos anti-Sustancia P	Independiente	Cualitativa politómica	Nula= 0; Débil= 1; Moderada-Intermedia= 2; Fuerte= 3	Estudio microscópico IHQ cuantificado con Escala Allred
SP Extensión citoplasma	Porcentaje de citoplasmas de células tumorales teñidos con anticuerpos anti-Sustancia P	Independiente	Cualitativa politómica	0%= 0; <1%= 1; 1-10%= 2; 10-33%= 3; 33-66%= 4; ≥66%= 5	Estudio microscópico IHQ cuantificado con Escala Allred

Nombre variable	Definición conceptual	Tipo variable	Naturaleza variable	Ninguna	Fuente de datos
SP global citoplasma	Puntuación global obtenida mediante la suma de la intensidad y distribución de la inmunotinción con anticuerpos anti-SP según la puntuación de Allred a nivel citoplásmico de las células tumorales	Independiente	Cuantitativa escala	Escala del 0-8	Estudio microscópico IHQ cuantificado con Escala Allred
SP Intensidad núcleo	Intensidad de la tinción inmunohistoquímica a nivel del núcleo de las células tumorales con anticuerpos anti-Sustancia P	Independiente	Cualitativa politómica	Nula= 0; Débil= 1; Moderada-Intermedia= 2; Fuerte= 3	Estudio microscópico IHQ cuantificado con Escala Allred
SP Extensión núcleo	Porcentaje de núcleos de células tumorales teñidos con anticuerpos anti-Sustancia P	Independiente	Cualitativa politómica	0%= 0; <1%= 1; 1-10%= 2; 10-33%= 3; 33-66%= 4; ≥66%= 5	Estudio microscópico IHQ cuantificado con Escala Allred
SP Global núcleo	Puntuación global obtenida mediante la suma de la intensidad y distribución de la inmunotinción con anticuerpos anti-SP según la puntuación de Allred a nivel nuclear de las células tumorales	Independiente	Cuantitativa escala	Escala del 0-8	Estudio microscópico IHQ cuantificado con Escala Allred
SP Intensidad estroma	Intensidad de la tinción inmunohistoquímica a nivel de las células estromales con anticuerpos anti-Sustancia P	Independiente	Cualitativa politómica	Nula= 0; Débil= 1; Moderada-Intermedia= 2; Fuerte= 3	Estudio microscópico IHQ cuantificado con Escala Allred
SP Extensión estroma	Porcentaje de células estromales teñidos con anticuerpos anti-Sustancia P	Independiente	Cualitativa politómica	0%= 0; <1%= 1; 1-10%= 2; 10-33%= 3; 33-66%= 4; ≥66%= 5	Estudio microscópico IHQ cuantificado con Escala Allred

Nombre variable	Definición conceptual	Tipo variable	Naturaleza variable	Ninguna	Fuente de datos
SP Global estroma	Puntuación global obtenida mediante la suma de la intensidad y distribución de la inmunotinción con anticuerpos anti-SP según la puntuación de Allred a nivel de las células estromales	Independiente	Cuantitativa escala	Escala del 0-8	Estudio microscópico IHQ cuantificado con Escala Allred
NK1-R Intensidad citoplasma	Intensidad de la tinción inmunohistoquímica a nivel del citoplasma de las células tumorales con anticuerpos anti-NK-1R	Independiente	Cualitativa politómica	Nula= 0; Débil= 1; Moderada-Intermedia= 2; Fuerte= 3	Estudio microscópico IHQ cuantificado con Escala Allred
NK1-R Extensión citoplasma	Porcentaje de citoplasmas de células tumorales teñidos con anticuerpos anti-NK-1R	Independiente	Cualitativa politómica	0%= 0; <1%= 1; 1-10%= 2; 10-33%= 3; 33-66%= 4; ≥66%= 5	Estudio microscópico IHQ cuantificado con Escala Allred
NK1-R Global citoplasma	Puntuación global obtenida mediante la suma de la intensidad y distribución de la inmunotinción con anticuerpos anti-NK1-R según la puntuación de Allred a nivel del citoplasma de las células tumorales	Independiente	Cuantitativa escala	Escala del 0-8	Estudio microscópico IHQ cuantificado con Escala Allred
NK1-R Intensidad núcleo	Intensidad de la tinción inmunohistoquímica a nivel del núcleo de las células tumorales con anticuerpos anti-NK-1R	Independiente	Cualitativa politómica	Nula= 0; Débil= 1; Moderada-Intermedia= 2; Fuerte= 3	Estudio microscópico IHQ cuantificado con Escala Allred
NK1-R Extensión núcleo	Porcentaje de núcleos de células tumorales teñidos con anticuerpos anti-NK-1R	Independiente	Cualitativa politómica	0%= 0; <1%= 1; 1-10%= 2; 10-33%= 3; 33-66%= 4; ≥66%= 5	Estudio microscópico IHQ cuantificado con Escala Allred

Nombre variable	Definición conceptual	Tipo variable	Naturaleza variable	Ninguna	Fuente de datos
NK1-R Global núcleo	Puntuación global obtenida mediante la suma de la intensidad y distribución de la inmunotinción con anticuerpos anti-NK1-R según la puntuación de Allred a nivel nuclear de las células tumorales	Independiente	Cuantitativa escala	Escala del 0-8	Estudio microscópico IHQ cuantificado con Escala Allred

