11262
3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
LABORATORIO DE PATOLOGÍA EXPERIMENTAL,
SERVICIO DE UROLOGÍA
Y UNIDAD DE EPIDEMIOLOGÍA CLÍNICA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

ANALISIS COMPARATIVO DEL NÚMERO DE CELULAS INMUNORREACTIVAS CONTRA INTERLEUCINA-2 EN HIPERPLASIA Y ADENOCARCINOMA PROSTÁTICOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

P R E S E N T A

VÍCTOR FIGUEROA GRANADOS

Tutor: Dr. Rogelio Hernández Pando

Co-tutor: Dr. Antonio Villa Romero

286669

INCMN SZ

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL. Septiembre 2000

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
LABORATORIO DE PATOLOGÍA EXPERIMENTAL,
SERVICIO DE UROLOGÍA
Y UNIDAD DE EPIDEMIOLOGÍA CLÍNICA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

ANALISIS COMPARATIVO DEL NÚMERO DE CELULAS INMUNORREACTIVAS CONTRA INTERLEUCINA-2 EN HIPERPLASIA Y ADENOCARCINOMA PROSTÁTICOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

P R E S E N T A

VÍCTOR FIGUEROA GRANADOS

INNSZ

Tutor: Dr. Rogelio Hernández Pando

Co-tutor: Dr. Antonio Villa Romero

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL. Septiembre 2000

ABSTRACT

Purpose: The proliferation and activation of the immune system cells against tumor cells is greatly influenced by cytokines such as Interleukin 2 (IL-2), a Th1 (T helper 1) cytokine. The role of this cytokine on the growth and differentiation of prostate cancer cells has been partially studied. However, to our knowledge the number of IL-2 immunorreactive cells in specimens of human prostatic adenocarcinoma (CaP) and benign prostatic hyperplasia (BPH) has not been previously determined and compared.

Materials and methods: In 58 prostatic from patients with CaP and 58 with only BPH, the number of IL-2 immunorreactive cells located in the periglandular spaces was determined in the periglandular spaces. Standard immunohistochemistry staining techniques were applied to specimens using monoclonal antibodies to IL-2 (Genzime inc, Boston. Mass.) Color images of IL-2 immunohistochemistry stained slides were digitally acquired and analyzed using a standard image analysis system. Representative glands in each slide were imaged with a 40 X objective and a 10 X eyepiece. Number of IL-2 positive cells in the periglandular stroma were counted, and the glandular elements and the luminal areas were excluded from analysis

Results: The number of IL-2 immunorreactive cells in cancer specimens was lower than in prostate hyperplasia (Mann-Whitney U-test, $p<0.00001$). There was also astatistically significant correlation between the Gleason score and the number of anti IL-2 positive cells in prostate adenocarcinoma (Spearman $r= -0.53$, $p<0.00001$) but PSA did not significantly correlate with the cell positivity (Spearman $r =-0.3$). In the univariated unconditional logistic regression analysis, the mean cell positive nember was associated with a less probability to be a case (O. R.=0.58, $p<0.00001$).

CONTENIDO

Portada
Abstract 2
Índice de contenido 4
Abreviaturas 5
I. Marco teórico 6
Introducción 6
Antecedentes 11
II. Justificación 13
III. Objetivos 14
IV. Hipótesis 15
V. Material y métodos 16
Diseño del estudio 16
Tamaño de la muestra 16
Población de estudio 17
Criterios de inclusión 17
Criterios de exclusión 18
Criterios de eliminación 18
Captación de los casos 19
Esquema de seguimiento 19
Consideraciones éticas 21
Evaluación del estado basal 21
Descripción del procedimiento 22
VI. Definiciones operacionales 24
VII. Análisis estadístico 27
VIII. Resultados 28
IX. Discusión 38
X. Conclusiones 43
XI. Apéndices 45
Hoja de recolección 45
Flujograma 47
Clasificación del estado clinico en CaP 48
Técnica de Inmunohistoquimica 49
XII. Referencias 51

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribo Nucléico
APE	Antígeno Prostático Específico
APC	Células Presentadoras de Antígeno
CaP	Cáncer de próstata (para fines de este estudio, siempre es adenocarcinoma)
CTL	linfocito T citotóxico
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
HPB	Hiperplasia Prostática
INCMNSZ	Institulo Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán , México. D.F.
INFγ	Interferón gamma
IL2, IL1, 4,5,6,10,12,13	Interleucinas 2,1,4,5,6,10,12,13
Inhibidor LH RH	Inhibidor del factor de liberación de hormona luteinizante
IHQ	Inmunohistoquímica
LAK (células)	Células asesinas activadas por linfocinas
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
RNAm	Acido Ribonucleíco mensajero
Th1, Th2	T helper1 y2
TIL	Linfocitos infiltrantes de tumor
TCR	Receptor de células T
TGFβ	Factor de Crecimiento transformante beta

I. MARCO TEORICO

INTRODUCCIÓN

El adenocarcinoma de próstata (CaP) es una patología con una elevada incidencia, con 400,000 nuevos casos en un año, es el noveno cáncer más frecuentemente diagnosticado en el mundo. Si consideramos solamente al género masculino en todos los grupos de edad es el 4º cáncer más frecuentemente diagnosticado.

La mortalidad del CaP es también elevada y sus repercusiones económicas muy importantes. En un lapso de 12 meses, la mortalidad mundial atribuible al CaP, según la organización Mundial de la Salud se estimó en 204,000 sujetos, es decir casi 3% de todas las muertes causadas por cáncer en los sujetos masculinos de todo el mundo. [1]

En los últimos ocho años el número de casos diagnosticados de CaP se triplicó. Este salto en la incidencia es, en gran medida, el resultado de la introducción de pruebas diagnosticas como el Antígeno Prostático Especifico (APE) en combinación con el tacto rectal, lo que permite sospechar tempranamente esta neoplasia. Hasta con cinco años de anticipación, la elevación significativa del APE puede preceder a la presentación de cualquier síntoma relacionado con CaP. En el momento actual el estándar utilizado para la confirmación de los casos es la biopsia transrrectal de próstata. Con esto, el 33% de los sujetos mayores de 60 años presentarán CaP en algún fragmento de la biopsia transrrectal de próstata cuando se considere a la elevación del APE como el único criterio para realizarla y habiendo descartado prostatitis.

Uno de los graves problemas de la detección temprana se presenta en el contexto de que el CaP es una neoplasia no claramente predecible. Por eso, en los sujetos en los que se detecta tempranamente éste cáncer, no se puede identificar en cuales de ellos será la enfermedad *por la cual* morirán y no simplemente una enfermedad *con la* que morirán sin que jamás hubiese progresado. [2] Todo ello ha motivado la intensa búsqueda de marcadores pronósticos.

NUEVAS MODALIDADES TERAPEUTICAS EN CaP. La detección temprana del CaP mejora las posibilidades de curación, pero no ha tenido aún ningún impacto en la sobrevida específica de esta neoplasia.[3]

A pesar de que la enfermedad localizada es potencialmente curable mediante prostatectomía radical o radioterapia, al menos un tercio de los pacientes que se sometan a prostatectomía radical se encontrarán subsecuentemente con enfermedad no confinada al órgano. Además un 35% a 61% de los pacientes post radioterapia radical tendrán CaP en biopsias prostáticas. [4, 5] Por lo tanto, una significativa proporción de pacientes tratados con intento curativo quedan con tumor residual [6] y en ellos no se ha demostrado beneficio alguno con el tratamiento adyuvante ni de salvamento. Adicionalmente, a pesar del desplazamiento hacia los estadios tempranos de los CaP diagnosticados en los países donde el APE se ha utilizado en forma extendida, una gran proporción de sujetos se siguen presentando con estadios avanzados de la enfermedad.

Desde 1940, la deprivación androgénica en forma de una orquiecomía, análogos de factor liberador de hormona luteinizante (LHRH) y antiandrógenos han sido las piedras angulares del tratamiento del CaP metastásico [7]. Sin embargo muchos de los pacientes muestran progresión de la enfermedad en un periodo que va de 1-18 meses, y ningún tipo de tratamiento ha demostrado extenderlo. Una vez que es detectada la hormono resisitencia, la sobrevida es típicamente de 2-3 años a partir de ese momento [8]. Las limitaciones de las formas actuales de tratamiento han conducido a algunos investigadores a buscar otras modalidades, incluyendo terapia génica, apoyándose en ciertas características que hacen al CaP un modelo ideal para la terapia génica.

Las características mencionadas hacen del CaP un modelo excelente para el estudio de la inmunidad antitumoral. Así la utilización de mecanismos del propio sistema inmune parecen una opción promisoria en el tratamiento del CaP metastásico [9].

INMUNIDAD ANTITUMORAL

Las evidencias a partir de modelos animales sugieren que, al menos en los tumores sólidos comunes, la inmunidad celular es mediada por células T [10]. El reconocimiento de las células cancerosas como cuerpos extraños depende de la expresión de antígenos tumor específicos y de la expresión de complejos MHCI (complejo mayor de histocompatibilidad clase I) conocido cómo antígeno leucocitario humano (HLA). Las células T poseen receptores de células T (TCR) específicos en la superficie que reconocen complejos MHC/ antígeno. Los linfocitos T citotóxicos (CTL) son activados por al menos dos interacciones. La primera señal incluye el TCR interactuando con un antígeno endógenamente sintetizado, una secuencia peptídica de 8 a 11 aminoácios,

presentada en la superficie de las células en el surco de las MHCI. La activación del TCR resulta en la muerte de las células T. Sin embargo, se requiere de una segunda señal liberada ya sea por los linfocitos tal como lo es la IL-2 (también liberada por las células CD4+) o bien, a través de la interacción de ciertas moléculas de las células T (por ejemplo CD28) y moléculas coestimulatorias (por ejemplo B7/BB1) en las APC. En ausencia de tales señales coestimulatorias, las células que interactúan con un antígeno especifico presentado por MHC se hará anérgica para tal antígeno [11].

EL CANCER DE PROSTATA Y EL SISITEMA INMUNE

De acuerdo con la teoría de inmuno vigilancia de Burnet, el sistema inmune podría eliminar células malignas recientemente transformadas.[12] La evidencia de casos de regresión espontánea en melanoma y en el carcinoma de células renales, sustenta la idea de que el sistema inmune puede ser capaz de retardar la progresión tumoral y en raros casos eliminar el tumor por completo. Sin embargo, no han sido reportadas regresiones espontáneas en el CaP y por eso fue descrito como un blanco inadecuado para la inmunoterapia. De hecho en algún momento se pensó que la próstata era un lugar inmunológicamente privilegiado. [13] Esto se afirmó por que la próstata aparentemente carecía de linfáticos [14], pero ahora existe evidencia de que la próstata tiene linfáticos y que puede producir localmente una respuesta inflamatoria. [15,16] Más recientemente, se ha sugerido que la respuesta inmune en el CaP puede estar asociada con el pronóstico. En pacientes con diagnostico de CaP y seguimiento a largo plazo, la densidad de TIL fue un factor pronóstico independiente del grado del tumor para predecir progresión. [17]

Se sabe desde hace algún tiempo que los pacientes con CaP avanzado tienen defectos en la inmunidad celular, [18] otras observaciones incluyen niveles más bajos de INF-γ en cultivos de células sanguíneas estimuladas con mitógenos provenientes de pacientes con CaP metastático al compararlas con células provenientes de controles y pacientes sin enfermedad metastásica.[19] Estos y otros estudios demostraron que el CaP puede evadir la detección por el sistema inmune, mediante la presentación defectuosa de antígenos. Dos de cinco líneas celulares de CaP metastásico en humanos, mostraron defectos en la expresión de MHCI en las superficies celulares. [20] La expresión defectuosa de TAP-2, un mediador clave del transporte antigénico y ensamblaje de MHCI, fue responsable de que en una línea celular de función anormal del producto del gen de la cadena pesada y posiblemente debido a procesamientos postranscripcionales defectuosos, en otra. Un estudio de tejido prostático de 47 pacientes con CaP sugirió que el defecto en MHCI es casi ubicuo. [21] La pérdida completa de la expresión de MHCI se presentó en el 34% de los CaP de próstata primarios y en el 80% de las metástasis linfáticas. Además, la regulación negativa fue más dramática cuando la expresión de los alelos individuales de MHCI se estudiaron, presentandose en el 85% de los tumores primarios y en el 100% de la metástasis. Estos hallazgos pueden explicar el por que de la falla en la estimulación de la respuesta inmune observada en los CaP que progresan, sin embargo otros mecanismos de escape inmunológico descritos en otros tumores pueden ser igual o más importantes. Entre estos se incluyen la secreción de sustancias inhibitorias, por ejemplo el factor beta de crecimiento tumoral (TGFβ), IL-10, [22, 23] la transcripción anómala de la información en los linfocitos T [24] y la expresión del ligando de Fas por

los tumores, localmente podrían favorecer que las células tumorales indujeran apoptósis en las TIL que expresen Fas. [25]

ANTECEDENTES

La interleucina-2 (IL-2) también conocida cómo TCGF (T cell growth factor) la primera de todas las citocinas en ser descubierta [26] y descrita, es una proteína de 15.5 k D que juega un papel central en la regulación inmune, en el humano tiene 133 aminoácidos con diferentes grados de glicosilación [27]. IL-2 se secreta principalmente por los linfocitos T activados maduros dicha activación de linfocitos por antígenos específicos resulta en la generación de receptores de IL-2 (IL-2R) en su supericie. La subsecuente interacción del IL-2R del_linfocito con la IL-2 conduce a la proliferación celular lo que resulta en una respuesta inmune. [28]

De acuerdo con la nomenclatura de las citocinas de Clerici [29] la IL-2 es una citocina tipo 1 que se define cómo una fuerte respuesta inmune celular con niveles normales o incrementados de IL-2, INF-γ, TNFβ y /o IL-12 mientras que una respuesta tipo 2 se describe como una respuesta celular disminuida con un incremento en una o más actividades de las células B (hipergammaglobulinemia) y un incremento en los niveles de IL-4,IL-5,IL-6, IL-10 y /o IL-13.

Recientemente se demostró que los pacientes con CaP avanzados tienden a tener un perfil predominantemente Th2 de las citocinas en las células mononucleares de sangre periférica con una baja proporción de células productoras de INFγ e IL-2 y una mayor proporción de células secretoras de IL-4. [30]

Las citocinas Th1 y Th2 deben inducirse en situaciones diferentes entre si, un ejemplo es la mayor inducibilidad del RNAm de IL 2 en el cáncer de células transicionales de la vejiga durante el tratamiento con BCG que tiene un alto valor predictivo de remisión (97%). Así la inducibilidad del RNAm de IL 2 es un valor de pronóstico independiente y un indicador confiable de remisión *versus* recaída. [31] Sin embargo, hasta hoy no existen reportes de la medición de la expresión tisular de IL-2 por métodos inmunohistoquímicos en el tejido prostático . El propósito de éste trabajo fue comparar la expresión de IL-2 entre especimenes con Cáncer de Próstata (CaP) y otros con hiperplasia prostática (BPH) .

II. JUSTIFICACIÓN

El CaP sigue siendo un grave problema de salud mundial. Una de las estrategias promisorias en el tratamiento de ésta neoplasia es la inducción de modificaciones en la inmunidad antitumoral. Al respecto existe día con día mayor número de reportes acerca de la utilidad de la IL-2, en forma de inmunoterapia y otras modalidades para el tratamiento del CaP.

Sin embargo, hasta hoy la inmunotinción contra IL-2 en el tejido prostático humano no ha sido descrita ni se ha intentado medir la correlación entre ésta citocina y el riesgo para desarrollar CaP.

Dado que la IL-2 cumple localmente con funciones inmunorreulatorias, la simple descripción de diferencias en la cantidad de dicha citocina entre los sujetos con y sin CaP, puede tener implicaciones en la identificación de riesgos para el desarrollo de la neoplasia. Mas ambiciosamente para los sujetos en los que se establezca el diagnóstico de CaP podría tener implicaciones pronósticas, medidas a partir del mismo espécimen prostático donde se hace el diagnóstico.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Hacer la primera descripción de la prevalencia de detección por IHQ de IL-2 en los linfocitos del tejido prostático parafinado humano en el adenocarcinoma e hiperplasia de próstata.

OBJETIVOS ESPECIFICOS;

1- Comparar la frecuencia e intensidad de detección de IL-2 entre los tejidos parafinados de próstatas con y sin evidencia histológica de adenocarcinoma.

2.- Comparar la frecuencia e intensidad de detección de IL 2 en los tejidos parafinados prostáticos entre sujetos con y sin elevación del APE por arriba de 40ng/ml (10 veces mayor que el valor de referencia).

3.- Describir, si existe, la asociación entre las etapas clínicas mayores del CaP al momento del diagnostico histopatológico con la menor* frecuencia e intensidad de detección para la IL 2.

4.- Describir, sí existe, la asociación entre la suma de Gleason 7 ó mayor del adenocarcinoma al momento del diagnostico histopatológico con una menor* frecuencia e intensidad de detección para la IL 2.

5.- Describir, si existe, la asociación entre una mayor* frecuencia e intensidad de detección para la IL 2 y la evolución favorable (vivo libre de actividad) a 24 meses del momento del diagnostico histopatológico de adenocarcinoma.

IV. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERAL

1.-La prevalencia de detección positiva de IL -2 es mayor* en los linfocitos presentes en los tejidos con hiperplasia al compararlos con los de los sujetos con CaP.

HIPÓTESIS SECUNDARIAS

1.-La frecuencia e intensidad de detección de IL 2 en los tejidos parafinados de próstatas provenientes de sujetos con evidencia histológica de adenocarcinoma será menor* que en los tejidos de sujetos en quienes se descartó dicho diagnostico.

2.-La frecuencia e intensidad de detección de IL 2 en los tejidos parafinados prostáticos de sujetos con elevación del APE 10 veces por arriba de los valores normales será menor*que en los extraídos de sujetos con valores por abajo de dicha referencia.

3.-Existe relación inversa entre los estadios clínicos avanzados al momento del diagnostico histopatológico con la frecuencia e intensidad de detección positiva de IL-2 en el tejido prostático parafinado.

4.-Existe relación inversa entre la suma de Gleason del adenocarcinoma al momento del diagnostico histopatológico con la frecuencia e intensidad de detección positiva de IL-2.

5.-Existe asociación entre una mayor* frecuencia e intensidad de detección de IL 2 con la evolución favorable (vivo libre de actividad del adenocarcinoma) a 24 meses del momento del diagnostico histopatológico.

**ver definiciones operacionales*

V. MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de casos y controles, no pareado.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Dado que no existen estudios en los que se haya medido IL-2 en tejido prostático, basamos el tamaño de la muestra en el único estudio previo que determinó la inductibilidad de RNAm de IL 2 en sujetos con cáncer de células transicionales en progresión contra sujetos con remisión, después del tratamiento con BCG. Así la prevalencia de positividad esperada de IL 2 en los sujetos con CaP la estimamos en 5 % (0.05) y para los sujetos con HPB la prevalencia esperada de positividad la calculamos en 29% (0.29).

Utilizamos $Z\alpha$ de 0.05 y $Z\beta$ de 10

Considerando que este es un estudio no pareado . Calculamos con el programa Epidat y en base a la siguiente fórmula [32]

$$n = 2\,\bar{p}\,\bar{q}\,(z\alpha + z\beta)^2 \;/\; (p_1 - p_o)^2$$

Simplificada : $n = 21\,\bar{p}\,\bar{q} \;/\; (p_1 - p_0)^2$

*****2 $\bar{p}\bar{q}$ = denota que en las muestras no pareadas de casos y controles la razón de monomios se puede probar por medio de una Chi cuadrada . p0 = la proporción de expuestos entre los controles.**

Estimamos entonces que con un tamaño de muestra de 58 casos y 58 controles, podíamos comprobar las hipótesis establecidas usando como prevalencia de expuestos y no expuestos (.05) y (0.29) respectivamente. [31]

Con un nivel de significancia estadística de 0.05 y un poder estadístico de 90% .

LIMITE DE ERROR

Arbitrariamente se tomó como límite del error ALFA 0.05.

De la misma manera el límite del error BETA se tomó como 0.10 .

La RAZÓN de MOMIOS mínima esperada fue de 2.0

POBLACIÓN DE ESTUDIO:

Todos los sujetos masculinos que como casos consecutivos acudieron de enero de 1994 a enero de 1998 al servicio de urología del INCMNSZ y que contaran con tejido prostático incluido en parafina obtenido por cualquier método (biopsia transrrectal, biopsia transperineal, resección transuretral, prostatectomía suprapúbica transvesical, prostatectomía retropúbica).

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

CaP

1. Sujetos masculinos de cualquier edad.
2. Con registro en el INCMNSZ.
3. Con material parafinado de tejido prostático.
4. Con diagnóstico histopatológico de Adenocarcinoma de próstata *de novo* establecido en el INCMNSZ.

* Si el paciente hubiese tenido dos biopsias positivas para adenocarcinoma de próstata se tomaría tejido del primer bloque tomado durante el período del estudio.

HPB

1. Sujetos masculinos de cualquier edad .
2. Con registro en el INCMNSZ.
3. Con material parafinado de tejido prostático.
4. Con diagnóstico de Hiperplasia prostática *de novo* establecido en el INCMNSZ.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

CaP

1. Historia y / o bloqueo androgénico al momento de la biopsia

2.- No contar con material parafinado suficiente (un bloque mínimo) de tejido prostático para la realización de los cortes e IHQ.

HPB

1. Con historia de al menos una biopsia positiva de adenocarcinoma de próstata.

2.- No contar con material parafinado suficiente (descrito previamente).

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

CaP

Se eliminaría del grupo CaP a los sujetos que tuvieran diagnóstico inicialmente de Adenocarcinoma pero se corroborara por ambos patólogos que correspondía a cualquier otro diagnóstico excepto adenocarcinoma de próstata.

HPB

Se eliminaría del grupo HPB a todos los pacientes: 1. cuyo diagnóstico histológico inicialmente de hiperplasia nodular se confirmara como adenocarcinoma por dos patólogos experimentados y en forma independiente y ciega. a) En esta situación el paciente podría ingresar al grupo de CaP sí y solo sí, el diagnóstico se establecía en el periodo comprendido por el estudio lo que sería una transferencia válida y necesariamente descrita en el análisis. (Ninguno de éstos criterios se presentó).

CAPTACIÓN DE LOS CASOS (ESQUEMA DE MUESTREO)

Los pacientes se identificaron en el momento en que ya se había establecido el diagnóstico de rutina por el departamento de patología del INNSZ (de acuerdo con los libros de registro).

Se hizo revisión por semestres de los archivos de patología de enero de 1994 y hasta enero de 1998 de los diagnósticos que según los archivos correspondían con cualquier diagnóstico histológico en el tejido prostático, al identificar algún diagnóstico histopatológico de CaP y HPB: Se anotó el número de registro patológico y clínico, y así consecutivamente, comenzando cronológicamente en enero de 1994. (Apéndice 2)

ESQUEMA DE SEGUIMIENTO

A partir de su captación (momento cero) cuando se dio el diagnóstico histológico en el tejido prostático parafinado, a) se realizó un seguimiento RETROLECTIVO recolectando los datos especificados en la hoja de recolección de datos que a su vez se integraba al expediente del estudio b) Se solicitaron los bloques de material parafinado c) Se obtuvieron las laminillas teñidas con hematoxilina y eosina d) Se

hicieron series de cortes y se montaron en laminillas silanizadas e) Se realizaron tinciones por IHQ para IL 2.

El manejo de los pacientes no se modificó por los resultados del presente estudio y corrió a cargo del médico tratante quien realizó durante el seguimiento gammagrafía ósea, serie ósea metastásica y otros estudios convencionales para estadificar a cada caso.

ESTRATEGIAS DE SORTEO

El tejido prostático parafinado de todos los sujetos elegibles 261 (128 HPB y 133 CaP) que reunían los criterios de inclusión se sortearon independientemente y de acuerdo a unas tablas de números aleatorios, para obtener de cada grupo 58 casos y 58 controles respectivamente. CEGAMIENTO; Con un orden aleatorio y de manera ciega a los datos clínicos se realizaron partidas de 10 laminillas por día realizando por IHQ a inicialmente a tres diferentes concentraciones (1:20, 1:50, 1:100,1:250, Datos no mostrados) hasta que se identificó que la dilución 1:250 era la óptima para determinar la presencia de IL 2 en el tejido. CEGAMIENTO SECUENCIAL; Se recabaron del expediente los datos clínicos de interés y la información demográfica (apéndice 1) con mínimo de 3 meses de anticipación a la realización de las lecturas de la IHQ en todos los casos. Las lecturas automatizadas de la técnica de IHQ fue supervisada por un solo observador que permaneció cegado a los datos demográficos, clínicos, laboratorio, y sólo una vez concluido el periodo de estudio se hizo el análisis de los mismos.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Debido a que el estudio se realizó en el tejido residual utilizado para fines diagnósticos de rutina previamente almacenado en el departamento de patología, y considerando que un BENEFICIO adicional que el paciente recibió al realizarse éste estudio fue una nueva revisión del caso por un patólogo experimentado. Así mismo, puesto que la determinación de la inmunotinción contra IL-2 se hizo sin costo alguno para el paciente. Y dado que el paciente ya había otorgado su consentimiento informado para la realización de el procedimiento diagnostico y esto no implicaba ningún RIESGO adicional para él, del que había corrido en la biopsia, no se pidió nuevamente CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Los miembros del comité de ética en investigación del INCMNSZ a recibieron una copia de éste protocolo.

La CONFIDENCIALIDAD de la información obtenida en éste estudio quedó sometida a las normas que rigen la investigación en humanos y no podrá ser utilizada fuera de dichas normas.

EVALUACIÓN DEL ESTADO BASAL

a) Diagnóstico histopatológico *de novo* b) Nivel de APE sérico por Radioinmunoanálisis (*CIS bio international, Cedes France). Este fue el último valor tomado en un período no mayor a los 6 meses anteriores al diagnóstico. c) Estadio clínico de la enfermedad según la clasificación de Withmore modificada por el Sloan Katterine Cancer Center (Apéndice. 3) Grado de diferenciación de la neoplasia según la clasificación de Gleason. e) Medición del Infiltrado inflamatorio. f) Las

comorbilidades de base principales presentes al momento del diagnóstico (por ejemplo la presencia de otra neoplasia). g). La utilización o no de inmunosupresores (metotrexate, esteroides, ciclofosfamida). h) El tratamiento recibido para el CaP y HPB i). Historia de bloqueo androgénico total o parcial, farmacológico o quirúrgico. j) Estado en la última consulta.

VARIABLES INTERMEDIARIAS

Número de células positivas en el tejido prostático por IHQ para IL-2

CONFUSORAS

Edad al momento del diagnóstico histológico.

Todas las anteriores fueron capturados en la hoja de recolección de datos (apéndice 1)

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

El principal PROCEDIMIENTO fue la tinción por inmunohistoquímica para IL 2 que se aplicó de manera semejante a ambos grupos según se describe en el (apéndice 4). Brevemente:

Immunohistoquímica. Los tejidos fueron fijados en formaldehido al 10%. Después de ser deshidratados en alcohol etílico a diferentes concentraciones, el tejido prostático se incluyó en parafina, cortado y teñido con Hematoxilina y Eosina para su estudio histológico de rutina. Para las técnicas de inmnunohistoquímica, se realizaron cortes de 5 µm. De espesor que se montaron en laminillas silanizadas. Los cortes de los tejidos fueron desparafinados , rehidratados e incubados con peroxido de hidrógeno al 3% diluido en metanol para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Luego los cortes fueron incubados por dos horas con anticuerpos monoclonales de

ratón anti IL-2 humano (Genzyme 80-3418-01,Boston. Mass.) diluido 1:250 en PBS. La detección de los anticuerpos unidos se realizó utilizando un juego completo de peroxidasa avidina biotina (Vector) y de acuerdo con el protocolo de manufactura. La actividad enzimática se reveló utilizando diaminobenzidina y contra teñida con hematoxilina. Para los cortes que utilizamos cómo controles negativos el anticuerpo primario fue omitido. Se utilizaron como controles positivos ganglios linfáticos.

Conteo celular. Utilizando un sistema automatizado de análisis de imágenes (Qwin Leica, Milton Keynes, U. K.), determinamos el número de células inflamatorias así como el número de linfocitos inmunorreactivos a IL-2 localizados en el tejido estroma que rodea a las glándulas neoplásicas en la próstata y cuyo diámetro interno fuera de un mínimo de 180-200μm (Figura 1). El sistema de cuantificación de células inmunorreactivas ya ha sido descrito [33], brevemente; un microscopio de luz se conectó a un sistema óptico digitalizado de obtención de imágenes y finalmente a una computadora que analiza tonos de colores, áreas y diámetros mediante un software comercial. Las lecturas automatizadas en cinco campos con un aumento de 200x se realizaron bajo la supervisión de un solo observador que permaneció cegado a los datos clínicos.

VI. DEFINICIONES OPERACIONALES

DEFINICIÓN DE ENFERMEDAD.

Se clasificó como portador de CaP y HPB a todo aquel sujeto en quien el análisis histopatológico de la biopsia demostró dichos diagnósticos de acuerdo con los siguientes criterios: 1.- Cambios morfológicos característicos según lo determinado por el patólogo de referencia (INCMNSZ). 2.- Se le estableció tal diagnóstico histopatológico por el patólogo experimentado y el patólogo de referencia.

ESPECTRO PATOLÓGICO

Los hallazgos histológicos fue desde hiperplasia benigna hasta adenocarcinomas poco diferenciados. En tanto que el grupo con hiperplasia prostática sólo se dividió en dos grupos de interés que son con infiltrado inflamatorio y sin infiltrado inflamatorio.

ESPECTRO CLINICO.

Fue desde carcinoma localizado a próstata hasta carcinoma metastásico. Por lo tanto el grupo con cáncer se subdividió de acuerdo al espectro clínico en estadios locales y avanzados de la enfermedad.

BLOQUEO ANDROGÉNICO

a)Quirúrgico.- Se refiere a orquiectomía bilateral.

b)Farmacológico.- Utilización de alguno de los siguientes fármacos estrógenos, antiandrógenos o análogos LH RH. [8]

DIAGNOSTICO DE NOVO. Primer diagnóstico histopatológico establecido en el tejido prostático en el periodo de estudio señalado (94-98).

ESTADIO CLÍNICO. Se utilizó el método A,B,C,D según Withmore (apéndice3)

ESCALA DE GLEASON. Clasificación histológica del grado de desdiferenciación de un adenocarcinoma de próstata y corresponden a :

a.- poco diferenciado	Gleason 1 - 2
b.- moderadamente diferenciado	Gleason 3 - 4
c.- mal diferenciado	Gleason 5 en adelante

INHIBICION DE PROSTAGLANDINAS. Se consideró positiva si y sólo si se registró en una nota en el expediente, en los 6 meses previos a la biopsia, la utilización de Indometacina, y otros inhibidores .

INMUNOSUPRESIÓN. La utilización de alguno de los siguientes fármacos: Ciclofosfamida, Metotrexate, Corticosteroides o algún fármaco calificado como inmunosupresor por su médico tratante en el expediente clínico en los últimos 6 meses.

PATÓLOGO EXPERIMENTADO. Un sólo patólogo que cegado a los datos clínicos interpretó aleatoriamente laminillas teñidas por técnica de IHQ con CaP y HPB para los fines de éste estudio.

PATÓLOGO DE REFERENCIA. El (los) patólogo(s) que analizó(aron) la pieza de la manera habitual y que emitió(eron) un diagnostico histopatológico no cegado a la sospecha o diagnósticos clínicos.

REACTIVIDAD POSITIVA CONTRA IL 2.

DEFINICIÓN TÉCNICA. La presencia de un producto colorido color ocre (cromógeno) debido a la reacción de oxidación con el sustrato (H_2O_2). En ausencia de tinción de fondo según lo evaluado por un experto.

DEFINICIÓN OPERACIONAL. Para fines del estudio se consideró positivo un campo si y sólo si coexistían los siguientes 2 criterios:

Manual y automatizado (Leica Q Win 1998).

1.- Al menos una célula positiva por campo seco fuerte en cualquiera de los 5 campos observados aleatoriamente en torno a una glándula prostática con cualquiera de sus diámetros de corte entre 150-180 micras.

2.-Interpretación de positividad por 2 analizadores al analizar el mismo campo

MAYOR INTENSIDAD DE REACTIVIDAD POSITIVA A IL 2.

Dadas las primeras series de nuestros resultados, la definimos como la positividad para IL-2 por IHQ igual o mayor al 10% de la proporción células positivas/ positivas + negativas.

FALLA DE LA TÉCNICA DE IHQ. Se consideró falla en la técnica de la inmunoperoxidasa si el control conocido positivo no tenía reactividad a la tinción específica para IL 2. En tal caso se realizó nuevamente la partida de tinciones hasta obtener tinción positiva para el control interno.

VARIABLES CELULARES. Los promedios de las cuentas de células anti IL-2 positivas (MeanPos. Cell Num) y anti IL-2 negativas (MeanNeg. Cell Num) de cada uno de los 116 especimenes estudiados fueron utilizados para crear dos nuevas variables como se indica a continuación:

1.- Prom. Propor. Cel = $\dfrac{\text{Prom. Num. Cel. Positiv.}}{\text{Prom. Num. Cel. Positiv.} + \text{Prom. Num. Cel. Negativ.}}$

2.- Prom. Num. Cel. Positiv. categorized in quartiles = Prom. Num. Cel. Positiv. QRT (Tabla 1).

CUMPLIMIENTO. Se definió en dos niveles 1.- Para el análisis histopatológico; si el paciente contribuyó con tejido para la realización de la inmunohistoquímica como cáncer o hiperplasia prostáticas. 2.- Para la correlación clínica; si aportó datos clínicos como estadio, co-morbilidades, extensión de la enfermedad, uso de inmunosupresores etcétera. como se registra en la hoja de captura de datos (apéndice).

VII. ANALISIS ESTADÍSTICO

Estadística. El número de células IL-2 positivas fue comparado entre los grupos con BPH y PC usando la prueba U de Mann-Whitney . La correlación entre dos variables siempre fue reportada de acuerdo con el coeficiente de correlación de Spearman. Para estimar la fuerza de la asociación con la probabilidad de ser caso obtuvimos la Razón de Momios a través del exponencial de los coeficientes en un análisis de regresión logística no condicional (por que es no pareado) en un modelo univariado. Todas las pruebas fueron hechas a dos colas y se estimó significancia estadística con una $p<0.05$. La estadística descriptiva se presenta siempre como promedio $\pm$ desviación estándar y en todos los casos los cálculos fueron hechos utilizando un software SPSS/PC (SPSS Inc. Chicago, IL.) excepto los IC que se calcularon con el programa EGRET (Cytel Software Corporation, Cambridge, MA).

En un modelo multivariado de regresión se controló por las variables confusoras.

CUMPLIMIENTO. Se definió en dos niveles 1.- Para el análisis histopatológico; si el paciente contribuyó con tejido para la realización de la inmunohistoquímica como cáncer o hiperplasia prostáticas. 2.- Para la correlación clínica; si aportó datos clínicos como estadio, co-morbilidades, extensión de la enfermedad, uso de inmunosupresores etcétera. como se registra en la hoja de captura de datos (apéndice).

VII. ANALISIS ESTADÍSTICO

Estadística. El número de células IL-2 positivas fue comparado entre los grupos con BPH y PC usando la prueba U de Mann-Whitney . La correlación entre dos variables siempre fue reportada de acuerdo con el coeficiente de correlación de Spearman. Para estimar la fuerza de la asociación con la probabilidad de ser caso obtuvimos la Razón de Momios a través del exponencial de los coeficientes en un análisis de regresión logística no condicional (por que es no pareado) en un modelo univariado. Todas las pruebas fueron hechas a dos colas y se estimó significancia estadística con una $p<0.05$. La estadística descriptiva se presenta siempre como promedio $\pm$ desviación estándar y en todos los casos los cálculos fueron hechos utilizando un software SPSS/PC (SPSS Inc. Chicago, IL.) excepto los IC que se calcularon con el programa EGRET (Cytel Software Corporation, Cambridge, MA).

En un modelo multivariado de regresión se controló por las variables confusoras.

VIII. RESULTADOS

Estandarización de las mediciones. Para mantener un óptimo nivel de exactitud se realizó validación interna del patólogo experimentado comparando el diagnóstico histopatológico dado en 100 casos de cáncer e hiperplasia dados por un patólogo de referencia. Obteniendo una alta concordancia (κ=.97). Para valorar la coeficiente de variación de la lectura manual entre observadores; las detecciones de IL-2 por IHQ fueron valoradas por dos observadores independientes y de manera ciega al diagnóstico e hipótesis de trabajo. Para la intra observador se le dieron (8 especímes) a el mismo observador (de los mismos casos) en dos tiempos distintos el mismo caso para que fueran leídas y se compararan resultados de cada uno (T estadística = 0.89). La variación intra espécimen; para evaluar la variación de la positividad a IL-2 entre las zonas de HPB y CaP de un espécimen seleccionamos niveles de zonas sin evidencia de CaP de bloques(17 en total) con dicho diagnóstico dado por el patólogo de referencia y fueron leídas por un mismo observador cegado. Los promedios de las lecturas fueron comparadas con las verdaderas HPB (T estadística = 0.91). Para valorar la coeficiente de variación de la lectura con el sistema Leica Q Win se realizaron los mismos procedimientos que para la lectura manual pero con los parámetros automatizados del mismo (κ=.99).

Hallazgos clínicos y de laboratorio . Los pacientes con CaP presentaron edades que variaron de 52 a 89 (71±8.7 años) mientras que los de HPB fueron de 53 a 90 (68.4±7.3 años). El tiempo de seguimiento en los pacientes con CaP fue 1.7±1.1.

Ninguno de los pacientes con HPB tuvo evidencia clínica de cáncer de próstata durante su seguimiento (1.18±1.15 años). En general ambos grupos de estudio fueron comparables en variables cómo la edad, peso , talla y variables de laboratorio (Tabla 1), pero resulta obvio que, dado que unos tienen cancer y los otros no el APE total en suero fue significativamente diferente 49.5±70.9 y 10.1±13.8 ($p<0.00001$ prueba U de Mann-Whitney) para los sujetos con CaP y HPB respectivamente. Otras variables con importantes diferencias entre grupos fueron el seguimiento y el peso máximo.

Variable	CaP n=58 Prom., D. S.	HPB n=58 Prom., D. S.	valor de *p*¤
Edad	71.2, 8.7	68.4, 7.3	.06
Seguimiento	1.75,1.13	1.18,1.15	0.006
Peso	69.6, 12.0	69.4, 11.3	0.9
Estatura	1.7, 0.07	1.65, 0.07	0.4
IMC	25.0, 3.8	25.3, 3.8	0.65
Peso Max.	77.7, 13.4	72.6, 11.0	0.02
Colesterol	183.7, 44.9	196.3, 45.6*	0.1
Trigliceridos *	141.8, 40.0	128.8, 65.0	0.8
APE	49.5, 70.9	10.1, 13.8	<0.00001

*3 datos faltantes , ¤ Estadística no paramétrica UMw.

Tabla 1. Caracteristicas generales de los pacientes incluídos

Evaluación histológica. El grado histológico del adenocarcinoma de próstata se estableció de acuerdo con la escala de Gleason, obteniendo los siguientes puntajes; 2 en 2, 3 en 4, 4 en 7, 5 en 11, 6 en 10, 7 en 13 , 8 en 3, 9 en 7 casos y 10 en 1 caso. El estadio clinico del grupo CaP se estableció en la forma convencional en cada uno de los 58 (100%) casos, cómo sigue; A 12(20.7%), B 17(29.3%), C 2(3.4%), D27(46.6%).

Solamente 17/58(29.3%) pacientes se sometieron a algún tipo de tratamiento quirúrgico incluyendo linfadenectomía y / o prostatectomía radical.

Además de tumor maligno los especimenes de biopsias prostáticas estaban compuestos de diferentes cantidades de epitelio benigno hiperplásico. Los controles sólo mostraban BPH como hallazgo, epitelio atrófico y ninguna evidencia de células neoplásicas(Figura 1A).

Medición de IL-2 tisular . encontramos evidencias de que la próstata humana tiene una variable cantidad de células inmunopositivas a IL-2, según lo medido por IHQ, en los espacios periglandulares El número de células positivas para IL-2 fue significativamente menor (Figura 1B) en los especimenes con CaP (4±2.7) cuando se compararon con los de HPB (10.0±4.9) ($p<0.00001$ prueba U de Mann-Whitney).

Las células IL-2 negativas fueron de 118±44.0 y 73±23.6 en el grupo con CaP y HPB respectivamente.

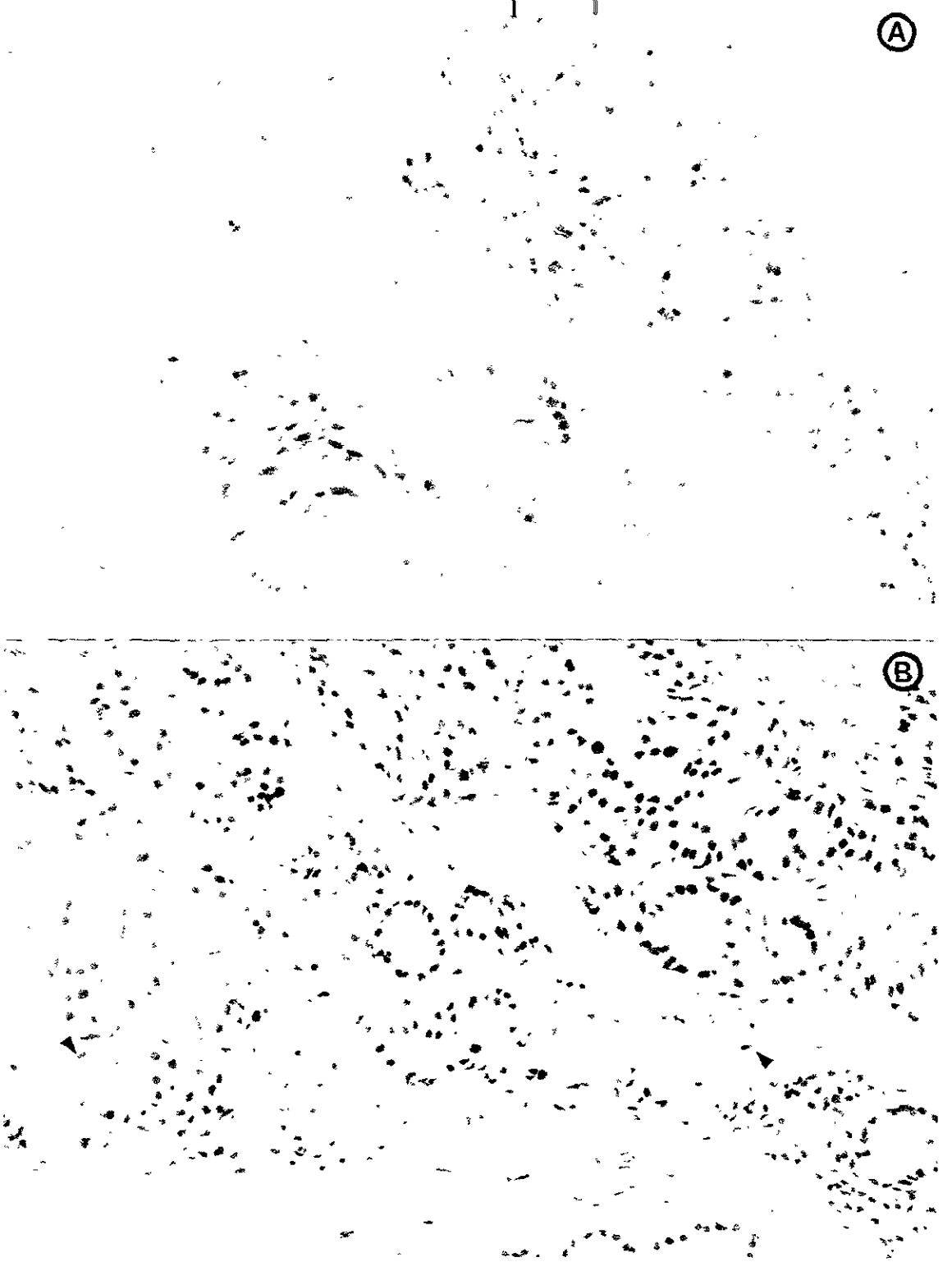

Figura 1.- Ejemplos representativos de la determinación por inmunohistoquímica de reactividad contra IL-2 en las células de lesiones neoplasicas de prostata. (A) Numerosas células inmunoteñidas por anti-IL-2 se localizan en el tejido fibroso que rodea a algunas glandulas hiperplasicas (x200). (B) En contraste , pocos linfocitos inmunorreactivos.contra IL-2 (flecha) se localizan contiguos a zonas de adenocarcinoma.

Los especimenes de ambos grupos de estudio presentaron características muy diferentes entre si (Tabla 2), mientras que la celularidad positiva se presentó menos abundantemente en los de CaP. L os tejidos sin evidencia de malignidad fueron menos celulares que los de CaP y parte de dichas células contabilizadas como células negativas por el sistema automático, correspondían con infiltrado inflamatorio en torno a la neoplasia, células del estroma prostático y las propias células neoplásicas (características de CaP como de HPB). Haciendo un conteo manual de células(cuarta fila), casi el 100 % correspondía a linfocitos

variable	CaP n=58 Prom, DS	HPB n=58 Prom, DS	Valor de *p* ¤
Células Positivas	4.0 , 2.7	10.0 , 4.9	<0.00001
Células Negativas	118.0 ,44.0	73.0 ,23.6	<0.00001
Proporción celular	3.4 , 2.6	12.5 , 4.6	<0.00001
Linfocitos Positivos	3.7 , 2.7	9.9 , 5.0	<0.00001

¤Estadística no parametrica.

Tabla 2. Variables celulares mediadas por medio del lector auomatizado (Qwin Leica) en 5 campos por cada uno de los 116 especímenes analizados.

En los especimenes estudiados el Promedio de las Proporciones Celulares (Prom Prop Cel) como se describe en la Figura 2 fue también significativamente diferente entre los casos y los controles , 3.4±2.7 y 12.5±4.6 para los grupos con CaP y HPB respectivamente. Encontramos una diferencia estadísticamente significativa (Prueba U de Mann-Whitney, p<0.00001). Podemos notar además que existen algunos valores extremos, pero aún eliminándolos la diferencia entre los grupos se conserva.

Observese que ni el valor aislado más alto de ésta variable en el grupo CaP supera al promedio de lo observado en HPB (12.5).

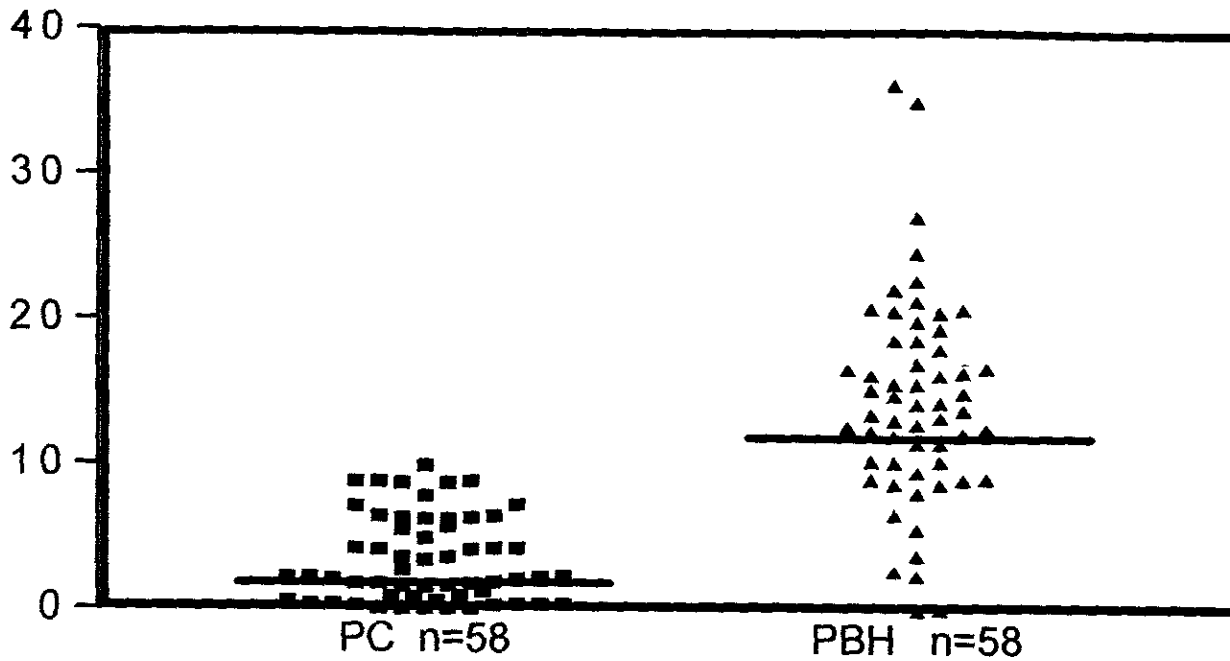

Figura 2.- Proporcion del número células positivas / positivas más negativas para la inmunotición anti-IL-2 (unidades en el eje de Y). Cada punto en los especímenes de CaP (■) y BPH (▲), representan el promedio del número de células en 5 campos. Las medianas se representan como lineas horoizontales (* Prueba U de Mann-Whitney, p<0.00001).

El numero de células inmunopositivas para IL-2 por campo en el grupo global (CaP y HPB) fue en promedio = 3.68, D. S. =2.76. Los 58 sujetos de cada grupo (CaP y HPB) se distribuyen de forma muy diferente entre si, cuando los separamos por cuartil de celularidad (Tabla 3). En contraste, las células inmunonegativas para IL-2 fueron en

promedio = 117.93 (±43.1). Las distribución de las células negativas, por cuartiles, entre los grupos fue en sentido inverso a la de las céluas positivas (datos no mostrados).

Numero de células que delimitan el cuartil	**CaP n = 58(%)**	**HPB n = 58(%)**	**cuartil**
0.0 –1.8 células/ campo	27 (46.6)	2 (3.4)	Q1
1.9 –5.5 células/ campo	24 (41.4)	12 (20.7)	Q2
5.6 –9.3 células/ campo	7(12.1)	16 (27.6)	Q3
9.4 –más células/ campo	0 (0.0)	28 (48.3)	Q4
total	**58(100)**	**58 (100)**	**116**

Tabla 3. Distribución de los 116 sujetos estudiados (CaP y HPB) en cada uno de los cuartiles de células positivas. Que demuestra la ausencia de sujetos con CaP en el cuartil celular superior y la distribución casi inversa de los sujetos con HPB.

Pudimos notar que la correlación negativa (Spearman = - 0.5, $p<0.00001$) entre el número de células positivas (Prom. Num. Cel. Pos.) y la suma de Gleason aunque inicialmente significativa, (Tabla 4) se incrementa importantemente cuando se busca correlación entre el Prom. Propor. Cel. y la suma de Gleason, (Spearman = -0.7, $p<0.00001$). Tal correlación queda más claramente ilustrada en un dispersograma donde solo aparecen los sujetos con CaP (Figura 3).

Cuando se usó el APE como variable independiente (Y) ,en sustitución de la suma de Gleason, para correlacionarse con las mismas dos variables previamente utilizadas, la correlación fue mucho menos importante como se puede ver en el último y penúltimo renglones (Tabla 4). Así la varianza explicada no rebasa al 10 % (r^2 =0.09, r^2 =0.1, respectivamente)

Variables Y / X	r	r^2	Valor de *p**
Prom Propor Cel / Suma de Gleason	- 0.7	0.5	<0.00001
Prom Num Cel Pos / Suma de Gleason	- 0.5	0.4	<0.00001
Prom Propor Cel / APE	- 0.3	0.1	0.0005
Prom Num Cel Pos / APE	- 0.3	0.09	0.0008

*T estadística

Tabla 4. Resultados del Análisis de correlación en el grupo CaP (n=58), donde se muestran coeficientes de Spearman negativos entre pares de una variable celular (PromProporCel ó PromNumCelPos) como variables dependientes y una variable con valor pronóstico; el antígeno prostático específico o la suma de Gleason (independientes, X).

Para aclarar como al menos una parte de los cambios en la proporción de celulas positivas a IL-2 podían ser explicados por el grado de malignidad obtuvimos un dispersograma de los 58 casos en los que se registró la suma de Gleason de la cúal tenemos una buena parte del espéctro en el dispersograma (Figura3). Es de notar que la correlación es negativa ya que los números de mayor peso específico, se distribuyen en esa dirección (Letras R) sin embargo , parece claro que los especímenes con HPB (columna de números que aparecen alineados con el eje de Y, por no tener Gleason) ocupan la parte superior del dispersograma en lo que se refiere a la celularidad.

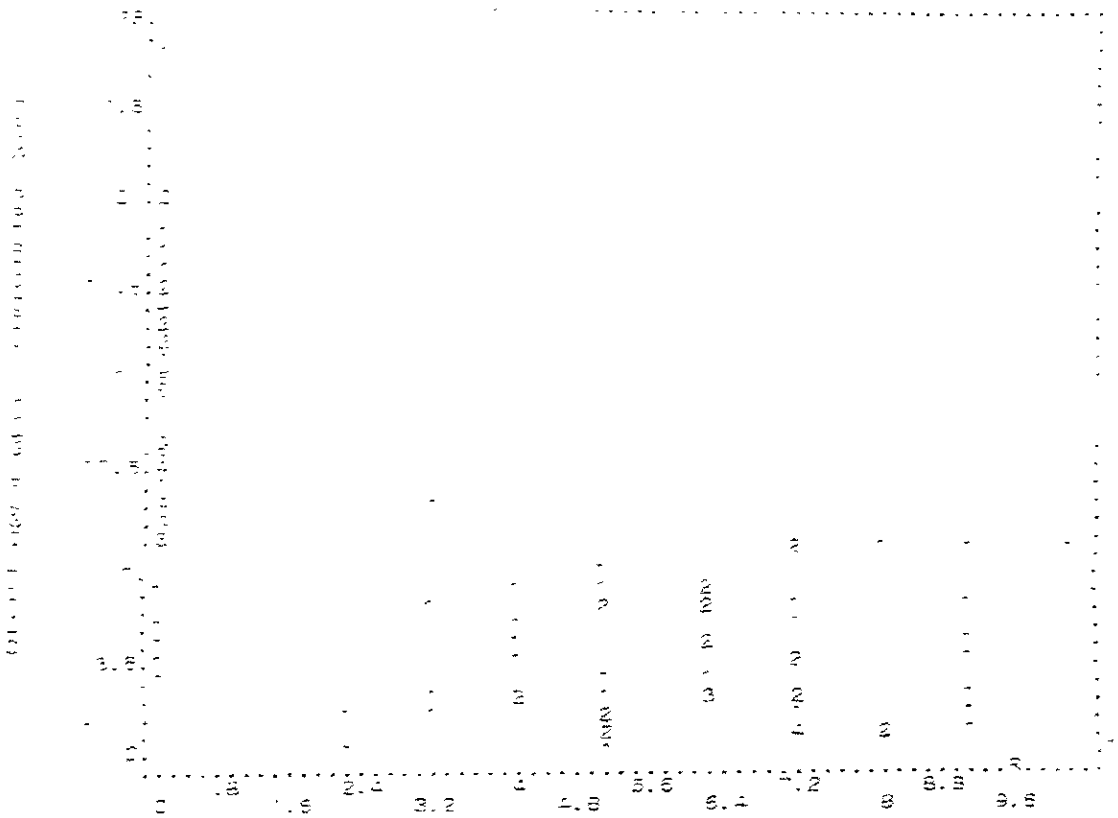

Figura 3. Dispersograma (SPSS/PC) que ilustra el coeficiente de Correlación de Spearrman entre dos variables; Promedio de Proporción de Células (eje de Y) y la suma de Gleason (eje de X). Los números dispersos en el interior del recuadro representan el número de sujetos en esa determinada coordenada ($r = -0.69$, $r^2 = 0.47$, Intercepto = 11.7 ± 0.54, Pendiente = 1.24 ± 0.12, $p<0.00001$).

En el análisis de regresión logística calculamos el riesgo de ser CaP (Tabla 5) observamos que, de las cuatro varibles celulares ahí resumidas, cada unidad de incremento en el Prom Num Cel Pos, se asocia con 1.72 veces menor riesgo de ser cancer (1/.58 = 1.72). Pero otras asociaciones de riesgo para CaP fueron el APE con una RM=1.04, p=0.02. El cambio en las células negativas que ya tenía una RM de 1.06 se incrementa hasta 8.5 cuando se categoriza por cuartiles. En lo que respeta al Peso máximo se asoció con RM =1.07, p<0.007. Paradójicamente el seguimiento que

fue significativamente diferente entre ambos grupos resultó ser una asociación de riesgo para CaP: Por cada año que aumentaba el seguimiento aumentaba el riesgo (1/RM =1/2.51) 15.13 veces el riesgo de ser CaP.

Variable	R. M.	I.C. 95%	valor *p**
Prom. Num. Cel. Positiv.	0.58	0.47-0.71	<0.00001
Prom. Num. Cel. Posit. QRT	0.14	0.07-0.27	<0.00001
Prom. Propor. Cel	0.48	0.36-0.64	<0.00001
Prom. Num. Cel. Negativ.	1.06	1.04-1.08	<0.00001

Tabla 5.- Descripción de cuatro variables celulares, las tres primeras asociadas con un menor y la última asociada a un mayor riesgo de ser caso (CaP) en el análisis de regresión logística no condicional (n = 116). Se muestran también los intervalos de confianza (I. C.) al 95% para cada razón de momios (R. M.).

IX. DISCUSIÓN

Por medio del presente estudio hemos demostrado claramente y por vez primera que algunas células presentes en el tejido prostático expresan la citocina, IL-2. Para hacer ésta descripción fueron seleccionados dos grupos de especimenes prostáticos, de pacientes que resultaron comparables en general y en cuanto a los factores de riesgo para el desarrollo de CaP. Si bien, resultó claro que el grupo con CaP tendió a tener en promedio una mayor edad, no existió significancia estadística. Pero ya desde las primeras descripciones de la incidencia de la enfermedad, se sabe que el CaP se presenta con mayor frecuencia en pacientes de edad avanzada. [34] Así aunque en ambos grupos de estudio se sospechara la presencia de una neoplasia maligna, resulta obvio que tendió a ocurrir una autoselección, por lo que los pacientes con CaP presentaron una mayor edad (U de Mann-Withney, p=0.69). Llama la atención que observáramos un menor seguimiento de los pacientes control (1.18±1.15) en comparación con los pacientes con CaP (1.75±1.13). Cuando esperaríamos observar el menor seguimiento en los portadores de la neoplasia maligna que puede significar *per se* una causa de muerte adicional a la mayor edad de ese grupo. Pero al analizar el estado a la última consulta (datos no mostrados), el menor seguimiento observado se debe a que los sujetos con HPB tiene un menor apego al hospital que los sujetos con CaP. Es decir, una vez que a los pacientes se les resuelve el problema obstructivo y / o se les descartó la existencia de algún tipo de cáncer, los pacientes con HPB dejan de

acudir al hospital más rápidamente que los pacientes con CaP. (U de Mann-Withney, p=0.02)

Antropométricamente las poblaciones eran comparables al momento del diagnostico, ya que el índice de masa corporal, peso corporal, y talla (variables aún no identificadas como factores de riesgo para el CaP) [35] fueron semejantes en ambos grupos. Solo el peso máximo referidio por el paciente a lo largo de su vida, fue significativamente diferente entre ambos grupos (U de Mann-Withney, p=0.02). Pero grandes estudios poblacionales no han confirmado a tal variable como factor de riesgo independiente para CaP. [36]

Se esperaba que los sujetos con cáncer tuvieran mucho mayor APE sérico lo cual fue corroborado en los resultados. La diferencia fue muy significativa entre ambos grupos de estudio, de acuerdo con estudios previos[2]. En nuestro estudio cada 1 ηg/ dl de incremento en el APE se asoció con un riesgo 4 veces mayor de ser caso (1/R. M = 4.11, p = 0.02). Si, como hemos observado, a una menor celularidad positiva también correspondió un mayor APE sérico, (r = -0.3, p = 0.0008) éste resultado tiene la misma dirección que los de estudios previos. En tales experimentos administrando IL-2 a un cultivo de células de cáncer prostático humano, se ocasiona una disminución del RNAm del APE, reduciéndolo hasta cinco veces con respecto al valor basal. [37] Quizá in vivo ocurra un fenómeno semejante y en los espacios periglandulares, el número de células inmunorreactivas a IL-2 sea inversamente proporcional a las positivas contra APE tisular. Resultará de gran interés el hacer doble marcaje en nuestros especimenes, pero el APE tisular no ha sido aún validado ni aceptado cómo marcador pronóstico en el CaP. [38]

El sistema inmune es responsable de la eliminación de las células malignas recientemente transformadas y por lo tanto la progresión hacia un tumor maligno representa al menos en parte la falla del sistema inmune. De tal manera que la progresión esté probablemente relacionada con dichas alteraciones, pues se ha demostrado que los pacientes con CaP avanzado tienen deficiencias en la inmunidad celular. [18] Los altos niveles de IL-2 que observamos en la prostata no maligna podría asociarse con la prevención de las anormalidades en la transducción de las células T [24] o quizás la mayor presencia de IL-2 estimule la eliminación de focos de la neoplasia maligna localmente. [39] En el estudio de Sokoloff y cols [37] la administración de IL-2 produjo en las células de adenocarcinoma prostático el aumento en la expresión de MHC I. Así para cumplir con sus funciones de; prevención de anormalidades en la transcripción de las células T locales [24] , favorecer la expresión de MHC I entre otras. Una célula inmunopositiva a IL-2 tiene obviamente un radio de acción limitado. Cada vez que incremente el número de células anti IL-2 negativas en torno a los TIL, la eficacia en el cumplimiento de sus importantes funciones antineoplásicas debe verse afectada. Es por eso que nos interesó estudiar también la proporción de células positivas con respecto al total de las células en el tejido (Prom. Prop. Cel.) que nos da una estimación de el número de células con las que tiene que interactuar una célula anti IL-2 positiva.

La suma de Gleason ha sido ampliamente utilizada como marcador pronóstico en el CaP. Más recientemente, se ha sugerido que la cantidad de linfocitos infiltrantes de

tumor (TIL) se asocian con pronóstico, estando la ausencia de ellos o su baja cantidad en el adenocarcinoma prostático asociado con un mayor riesgo de progresión tumoral así el número de TIL es un factor pronóstico [17] en sentido inverso al Gleason. En nuestro trabajo es muy probable que algunas de las células encontradas en los especímenes con CaP sean TIL. Así fue claro también que existe una correlación negativa entre Prom. Num. Cel. Pos y la suma de Gleason ($p<0.00001$). Esta relación reviste un gran interés dado que la suma de Gleason es un marcador pronóstico ampliamente validado.

Como se comentó algunas líneas celulares obtenidas a partir de adenocarcinoma de próstata metastásico humano tienen alteraciones moleculares que conducen a la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I) defectuoso en la superficie celular [21] que se corrigen en presencia de algunas citocinas. [37] Considerando además que otras citocinas, cómo INFγ y TNFα, favorecen la expresión e interacción del complejo MHC I unido al antígeno con los linfocitos T citotóxicos. Entonces es posible que el defecto en la respuesta inmune celular observado en los pacientes con CaP pueda ser secundario entre otras a una deficiente presentación del antígeno tumoral, baja producción de local de citocinas o ambas.

Con respecto a la producción deficiente de citocinas en los pacientes con CaP, se ha demostrado que existe una menor producción de INFγ por los linfocitos de sangre periférica después de estimulación con mitógenos cuando dichas células provienen de pacientes con CaP. [19] Más aún, se ha demostrado que los pacientes con CaP avanzado tienden a tener un patrón de citocinas predominantemente Th2 según métodos citofluorométricos que permiten detectar las citocinas dentro de las células

mononucleares en sangre periférica [30] esto armoniza con la descripción de un patrón de citocinas Th2 sobre el Th1 en varias neoplasias [40] y la disfunción de las respuestas Th1 que conducen al des balance en el índice Th1/Th2 en los pacientes con cáncer avanzado. [41] El reconocimiento de éste defecto de citocinas Th1 en los sujetos con CaP se ha utilizado en el diseño de terapias anti neoplásicas, tales como terapia génica. [42] De hecho , la inyección de células CaP previamente irradiadas y transfectadas con el gene de IL-2 destruyen tumores prostáticos subcutáneos en las ratas Dunning, e inducen células de memoria que protegieron a los animales contra retos posteriores con células cancerosas. [43] Así las células inmunopositivas podrían generar efectos antitumorales en el CaP [39]. Será interesante esclarecer cuanto dura el efecto protector de IL-2 y qué fenómenos mantienen la transcripción del gen. Aunque éste último se ha descrito como un proceso dinámico en el que, a tan solo 30 minutos de la estimulación de las células CD4+T, es posible detectar RNAm de IL-2. Pero a la vez se requiere de la presencia continuada del estímulo para mantener la transcripción de su gen [44].

X. CONCLUSIONES

Esta es la primera demostración de que en el tejido prostático humano existen células que se tiñen por métodos de IHQ para IL-2. Nuestros resultados corroboran y complementan otros estudios, al señalar que el infiltrado inflamatorio puede ser mayor en la vecindad de las glándulas neoplásicas pero que el número de células inmunorreactivas a IL-2 determinado en el sitio de la lesión es tres veces mayor en la HPB que en el CaP. Tal baja cantidad de linfocitos inmunomarcados para IL-2 podrían ser considerados una característica inmunopatológica distintiva de las neoplasias malignas de la próstata, lo cual pudiera posteriormente ser correlacionado con el pronóstico considerando la ligera correlación que nosotros encontramos con la suma de Gleason y el número de células IL-2 positivas. Sin embargo debemos tomar en cuenta que la HPB, aunque utilizada en la mayoría de los estudios de cáncer de próstata como control [45] o surrogado del tejido sano es también un estado de enfermedad caracterizado entre otros aspectos por proliferación vascular.

GENERACIÓN DE HIPÓTESIS

No podemos afirmar que las diferencias observadas sean inducidas por, o que sean consecuencia de la neoplasia prostática. Dado que recientemente ha sido demostrado que el gene de IL-2 tiene un polimorfismo [46] que tiene dos alelos comunes y que lo hacen un marcador ideal para estudios de asociación genética, la frecuencia de éstos alelos en CaP y HPB está siendo actualmente estudiada en nuestro laboratorio. Seguramente la presencia de un genotipo mutado se asociará directamente con la

mayor prevalencia de CaP e indirectamente con una menor cantidad de células IL-2 positivas como se ha demostrado en el presente trabajo

LIMITANTES DEL ESTUDIO

El diseño de nuestro presente estudio no permite saber si el bajo número de células inmunorreactivas a IL-2 es una causa o efecto de la neoplasia maligna prostática. Resulta prácticamente imposible encontrar candidatos con próstata normal, dada la alta prevalencia de hiperplasia prostática en los adultos de todo el mundo.

En el presente estudio solo estudiamos una citocina que es representante del grupo Th1, por lo tanto tenemos solo una visión parcial del balance citocínico. El patrón completo de citocinas, en el tejido prostático humano así como la influencia de las diferentes modalidades de tratamiento en su balance local deberá ser estudiado con enfoques diferentes al del presente estudio.

AGRADECIMIENTOS

El Dr. Figueroa-Granados fue becario del CONACYT y SSA México para la realización de sus estudios de maestría. El Dr. Villa recibe el ENDOMENT NOMINAL CHAIR "Antonio Carrillo Flores"

Es necesario agradecer la valiosa colaboración de Kutzi Arriaga y Anne Peasey, de los colegas Armando Méndez y Gloria Barrera por la aplicación de los anticuerpos monoclonales y anticuerpos secundarios. Así mismo al departamento de patología experimental por proporcionar el instrumental de laboratorio y equipo necesarios.

XI. APÉNDICES

APÉNDICE I

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

CARCINOMA DE PRÓSTATA INCMNSZ
BASE DE DATOS (1994-1998)

NOMBRE: _____ EDAD: _____
REGISTRO: _____ FECHA DE DIAGNÓSTICO: ____/____/____
1 - Co-Morbilidades Otra neoplasia sólida si ( ) no ( ) cuál _____
2 - Neoplasia Hematológica si ( ) no ( ) cuál _____
3 - Historia familiar de cáncer de próstata si ( ) no ( ) quién _____
4 - Historia familiar de cáncer de mama si ( ) no ( ) quién _____
a = padre/madre b = hermano/hermana c = otro
5 - Tabaquismo si ( ) no ( ) Indice tabaáquico: años ( ) No. de cigarrillos ( )
6 - Cirugías previas:

_____

_____

7 - FECHA DE BIOPSIAS
(1) ____/____/____ Dx: _____
8 - Dx. por BIOPSIAS
Transrrectales ( ) a Transperineales ( ) b
9 - HPB ( ) sin prostatitis ( ) a
con prostatitis aguda ( ) b
con prostatitis crónica ( ) c
10 - ADENOCARCINOMA ( )
sin prostatitis ( ) a
con prostatitis aguda ( ) b
con prostatitis crónica ( ) c
11 - A-1: ( ) 12 - B-1: ( )
A-2: ( ) B-2: ( )
A-3: ( ) B-3: ( )
A-4: ( ) B-4: ( )
A-5: ( ) B-5: ( )
13 - Patrones de Gleason ( ) y ( ) con suma de ( )
14 - Vesículas seminales : _____
15 - NIP: _____

_____

16 - Dx. por CIRUGÍAS RTUP ( ) a
b PROSTATECTOMÍA SIMPLE ( ) TRANSVESICAL ( ) b_1
RETROPÚBICA ( ) b_2
TRANSPERINEAL ( ) b_3
c PROSTATECTOMÍA RADICAL ( ) RETROPÚBICA ( ) c_1
TRANSPERINEAL( ) c_2
17 - TRATAMIENTO
RTUP ( ) a ____/____/____ OBSERVANCIÓN ( ) d ____/____/____
ORQUIECTOMÍA ( ) b ____/____/____ RADICAL ( ) e ____/____/____

BLOQUEO ANDROGÉNICO ( ) c ___/___/___ RADIOTERAPIA f ___/___/___

18 - OTROS FÁRMACOS

19 - INHIBIDOR DE PROSTAGLANDINAS (en los últimos 6 meses)

cuál _____ dosis _____/24 hrs Tiempo de administración _____

20 - INMUNOSUPRESIÓN si ( ) no ( ) cuál_____ dosis ____/24 hrs

21 - Diagnóstico del patólogo experimentado.- Adenocarcinoma ( ) a
Hiperplasia nodular ( ) b

22 - Diagnóstico de referencia.- Adenocarcinoma ( ) a
Hiperplasia nodular ( ) b

23 - Suma de Gleason ( ) + ( ) = ____

24 - Grado de Diferenciación

Bien diferenciado	1 - 2	( ) a
Moderadamente diferenciado	3 - 4	( ) b
Indiferenciado	5 - 9	( ) c

25 - INMUNOHISTOQUÍMICA PARA IL-2

1º campo	(√)	Positivos	( )
2º campo	(√)	Positivos	( )
3º campo	(√)	Positivos	( )

26 - INDICE = $\frac{\text{campos positivos}}{\text{campos estudiados}}$ = $\frac{(\ )}{(3)}$ = ( )

27 - EVOLUCIÓN

Vivo sin evidencia de actividad tumoral	( ) a	___/___/___
Vivo con evidencia de actividad tumoral	( ) b	___/___/___
Muerto sin evidencia de actividad tumoral	( ) c	___/___/___
Muerto por cáncer de próstata	( ) d	___/___/___

28 - ESTUDIOS DE GABINETE Positivo (+) Negativo (-)

a) Gamagrama óseo[1] ___/___/___ Dx: _____

b) Serie Ósea Metastásica[1] ___/___/___ Dx: _____

c) APE[2] último (en los 6 meses anteriores) FECHA ___/___/___ Valor _____

29 - OBSERVACIONES

Se sorteó el paciente? si ( ) número consecutivo ____ número aleatorio____
no ( ) porqué? _____

[1] El último de los resultados obtenidos en los 6 meses anteriores a la fecha del diagnostico histoptatológico *de novo*

[2] El último resultado obtenido en los 6 meses anteriores o posteriores a la fecha del diagnostico histopatológico *de novo*.

APÉNDICE 2

FLUJOGRAMA

DIAGNOSTICO HISTOPATOLÓGICO EN TEJIDO PROSTÁTICO (1994-1998)
(Patólogo de Referencia)

IDENTIFICACIÓN DE SUJETOS EXPUESTOS (CaP) n =130
CASOS

IDENTIFICACIÓN DE NO EXPUESTOS (HPB) n =128
CONTROLES

SI

OBTENCIÓN DE INFORMACIÓN
INFORMACIÓN
CLÍNICA
a) ESTADÍO CLÍNICO-PATOLOGÍA
b) GRADO GLEASON
c) TRATAMIENTO ESTABLECIDO
d) PRESENCIA DE INFILTRADO LINFOCITARIO

SI

OBTENCIÓN DE
CLÍNICA
a)GRADO DE INFILTRADO LINFOCITARIO

Incompleto

NO

Incompleto

ELIMINACIÓN (del análisis clínico)

SI

SI

OBTENCIÓN DEL TEJIDO PARAFINADO

CEGAMIENTO

CORTES CON MICROTOMO

H&E (interpretación patólogo experimentado.

INMUNOHISTOQUÍMICA — PCR** — Hibridación *in situ* **

LECTURA CUALITATIVA-CUANTITATIVA

Comparación entre
P. Experimentado v. s.
Patólogo de Referencia

ÍNDICES CAMPOS +/OBSERVADOS

ANÁLISIS
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

ELBORACIÓN DE DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

**** Nota.- —Maniobra Alternativa, no para fines de maestría..

APÉNDICE 3 CLASIFICACIÓN DEL ESTADIO CLÍNICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA SEGÚN WHITMORE[3]

A: Carcinoma no detectado clínicamente y encontrado como hallazgo durante una prostatectomía.

A1: Lesiones en menos del 5% del material revisado en patología y como una suma de Gleason menor de 7.

A2: Lesión en más del 5% del material estudiado, o bien etapas A1 con suma de Gleason mayor a 7.

B: Carcinomas localizados en próstata y detectados clínicamente.

B1: Nódulo no mayor de 1.5 cm. confinado a un lóbulo y rodeado de tejido sano.

B2: Tumor que involucra todo un lóbulo o más, pero intra prostático.

C: Tumor con extensión más allá de la cápsula prostática o bien invasión de vesículas seminales.

C1: Tumor menor de 6 cm. que penetra a través de la cápsula o a las vesículas seminales.

C2: Tumor mayor de 6 cm. que puede estar fijo a la pelvis o con invasión a la base de la vejiga, uréter o pared rectal.

D1: Metástasis a ganglio pélvicos.

D2: Metástasis a ganglio extra pélvicos o a distancia.

---

[3] Aarón Torres G., Alejandro R. Uribe, Narciso Hernández T., Manual para el tratamiento del cáncer Urogenital.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE 4

INMUNOHISTOQUÍMICA

Técnica de la Inmunoperoxidasa

1. Las laminillas se desparafinan con calor a 60° C.
2. Colocar las laminillas en un vaso de Copplin con Xilol por 3 minutos. Se realiza dos veces.
3. Luego 3 minutos en alcohol absoluto.
4. Finalmente en alcohol del 96° para eliminar el exceso de parafina e hidratar el tejido.
5. Para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena presente en las células, se incuban las laminillas durante una hora solución de Metanol-H2O2 30%.l
6. Incubar con alcohol de 96° durante 5 minutos.
7. Lavar dos veces con agua destilada.
8. Incubar en Buffer de Fosfatos Salino con Albúmina (PBS con Albúmina) por diez minutos.
9. Colocarlas en cámara húmeda con el anticuerpo primario, en función de la citocina que se esté determinando, diluido en PBS con Albúmina a la dilución convenida. El tiempo de incubación pude variar. Se recomienda un mínimo de tres horas.
10. Hacer varios lavados con PBS con Albúmina para eliminar el exceso de anticuerpo primario.
11. Incubar con el anticuerpo secundario que es un conjugado de peroxidasa con la dilución convenida en PBS con Albúmina durante una hora.
12. Recolectar el anticuerpo secundario residual para probar la solución reveladora por separado.
13. Repetir los lavados con PBS (sin albúmina).
14. Revelar con una solución de diaminobenzidina-H2O2 30% por 10 minutos aproximadamente o hasta que se aprecie visualmente un color café .
15. Se contratiñen con hematoxilina de Harris por veinte segundos .
16. Lavar con agua corriente y luego agua destilada. (Eliminar bien el exceso de hematolxilina).
17. Pasar rápidamente a carbonato de litio para que vire el color.
18. Repetir paso de lavado.
19. Deshidratar con alcoholes (alcohol del 96°, alcohol absoluto y xilol) tres minutos cada uno.
20. Finalmente montar con resina y se observar al microscopio a 10x y 40x.

REACTIVOS.

a) Solución de: METANOL- PEROXIDO DE HIDROGENO(30% H_2O_2)

Metanol Absoluto (Merck-7210) _____ 80.0 ml
30% Peroxido de Hidrógeno_____ 7.0 ml
Agua Destilada _____ 13.0 ml

b) BUFFER DE FOSFATOS 0.5 M, pH 7.6

Fosfato de Sodio, Di básico Na_2HPO_4 (sigma-50876) _____ 57.7 g
Fosfato de Sodio, Monobásico NaH_2PO_4 (Sigma-50751) _____ 12.9 g
AGUA DESTILADA _____
1000 ml

c) BUFFER DE FOSFATOS SALINO (PBS)

Buffer de Fosfatos _____ 100 ml
Solución Salina Isotónica 0.9 % _____ 900 ml

d) BUFFER DE FOSFATOS SALINO (PBS) - 3% BSA

Albúmina Sérica Bovina _____ 3.0 g V Fracción (Sigma A-4503)
PBS _____ 100 ml

e) Solución Reveladora de DIAMINOBENZIDINA (DAB)

DAB (Sigma A5637) _____ 1.0 miligramo
PBS _____ 1.0 ml
30 % H_2O_2 _____ 40 µl

XII. REFERENCIAS

1. WHO (1997) The World Health Report Geneva; World Health Organization
2. Foster, C.S., Cornford, P., Forsyth, L., Djamgoz, M. B, and KE,Y: The celular and molecular basis of prostate cancer. Br J Urol 83:171-194,1999
3. Hanks, G., Scardino, P., Does Screening For Prostate Cancer make Sense? *Sci. Am.* Sept: 80-81, 1996
4. Schellhammer, P. F., El-Mahdi, A. M., Higgins, E.M., et al: Prostate biopsy after definitive treatment by interstitial iodine 125 implant or external radiation therapy. J Urol 137:897-901,1987
5. Freiha, F.S., Bagshaw, M. A.: Carcinoma of the prostate: Results of post – irradiation biopsy. Prostate 5:19-23,1984
6. Crowford, D.: Hormonal therapy of prostatic carcinoma: defining chalenge. Cancer 66:1035-1038,1990
7. Huggins, C., Hodges, C.: Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. Cancer Res 1:293-297,1941
8. Crawford, E. D., Blumeinstein, B. A., Goodman, P. J., et al : Leuprolife with and without flutamide in advanced prostated cancer. Cancer 66:1039-1044, 1990 (suppl 5)
9. Hrouda, D., Dalgleish, A.G.: Gene theraphy for prostate cancer. Gene Therapy 3:845-852, 1996
10. Greenberg, P. D.: Adoptive T cell theraphy of tumors: Mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. Adv Immunol 49:281-355, 1991

11. Schwartz, R. H.: Costimulation of T lymphocyte:the role of CD28,CTLA-4 and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. Cell 71:1065-1068,1994

12. Burnet, F. M.: Immunological Surveillance.Oxford, UK; Pergamon,1970

13. Gittes, R. F., McCullough, D.L.: Occult carcinoma of the prostate: An oversight of immune surveillance-A working hypothesis. J Urol 112:241-244, 1974

14. Smith, M.: The lymphatics of the prostate. Invest Urol 3:439-441, 1966

15. Kelalis, P. P., Greene, L. F., Harrison, E. G.: Granulomatous prostatitis. JAMA 191:111-113, 1965

16. Neaves, W., Billingham, R.: The lymphatic drainage of the rat prostate and its status as an immunologically priviledged site,. Transplantation 27:127-132, 1979

17. Vesalainen, S., Lipponen, P., Talja, M., and Syrjänen, K.: Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltraiting lymphocites and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. Eur J Cancer 30A:1797-1803, 1994

18. Schellhammer, P. F., Bracken R. B., Bean R. B.: Immune evaluation with skin testing. Cancer 38: 149-156, 1976

19. Elssaser-Beile. U., von Kleist, S., Fischer, R., Martín, M., Wetterauer, U., Gallati, H., Schulte, J. M. : Impaired cytokine production in hole blood cell cultures of patients with urological carcinomas. J Cancer Res Clin Oncol 119:430-433,1993

20. Sanda, M. G., Restifo, N. P., Walsh, J. C., Kawakami, Y., Nelson, W. G., Pardoll, D.M. and Simons, J.W.: Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. J Natl Cancer Inst 87:280-285,1995

21. Blades, R. A, F.R.C.S., Keating, P. J., M.R.C.O.G., McWilliam, J., Path M.R.C., George, N.J.R., F.R.C.S., and Stern P.L.: Loss of HLA class I expression in prostate cancer. Urology 46: 681-687, 1995

22. Mukherji, B., Chakraborty, N. G.: Immunobiology and immunotherapy of melanoma. Curr Opin Oncol 7:175-184, 1995

23. Huber, D., Philipp, J., Fontana, A.: Protease inhibitors interfere with the transforming growth factor-beta-dependent but not the transforming growth factor-beta-independent pathway of tumor cell mediated immunosupression. J Immunol 148:277-284, 1992

24. Zier, K., Gansbacher, B., Salvadori, S.: Preventing abnormalities in signal transduction of T cells in cancer: The promise of cytokine gene therapy. Immunol Today 17:39-45,1996

25. Hane, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E, Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J. C, and Tschopp J: Melanoma cell expression of Fas (Apo-17CD95) ligand: Implications for tumor immune escape. Science 274:1363-1366, 1996

26. Morgan, D. A., Ruscetti, F. W., and Gallo, R.: Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. Science 193:1007-1008,1976

27. Théze, J., Alzari, P., Bertoglio, J., Interleukin-2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. Immunol. Today; 17:481-486, 1996

28. Smith, K. A.:Interleukin-2 inception, impact and implications. Science 240:1169-1176,1988

29. Clerici, M., and Shearer, G. M.: The Th1/Th2 hypothesis of HIV infection; new insights. Immunol. Today 15:575-581,1994

30. Hrouda, D., Baban, B., Dunsmuir, W. D., et al: Immunotherapy of advanced prostate cancer: A phase I/II trial using *Mycobacterium vaccae* (SRL172). Br J Urol 82:568-573,1998

31. Kaempfer, R., Gerez, L., Farbstein, H., Madar, L., Hirshman, O., Nussinovich, R., and Shapiro, A.: Prediction of Response of the treatment in Superficial Bladder Carcinoma Through Pattern of Interleukin-2 Gene Expression. J .Clin. Oncol. ; 14 (6); 1778-1786, 1996.

32. Schlesselman, J. Z.: Case-Control Studies. Design, Conduct, Analysis. Oxford University Press, 1982.

33. Hernández-Pando, R., Pavón, L., Orozco, H. et al: Interaction between hormone-mediated and vaccine-mediated immunotherapy for pulmonary tuberculosis in Balb/c mice. Immunology 100: 391, 2000

34. Scott, R., Mutchinik, D. L., Laskowski, T. Z., and Schmañhorst, W. R.: Carcinoma of the prostate in elderly men: Incidence, growth characteristics and clinical significance. J Urol 101:602-606,1969

35. Mills, P. K., Beeson, L., Philips, R. L., and Fraser, G. E: Cohort Study of diet, lifestyle, and prostate cancer in adventist men. Cancer 64:598-604, 1989

36. Whittemore, A. S., Kolonel, N. K., Wu, A. H., John, E. M., Gallangher, R. P., 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 87: 652-661, 1995

37. Sokoloff, M. H., Tso, C. L., Kaboo, R., Taneja, S., Pang, S., deKernion J. B., Beldegrun, A. S.: in vitro modulation of tumor progresión-associated properties of hormone refractory prostate carcinoma cell lines by cytokines. Cancer 77:1862-1872,1996

38. Weir, E. G., Partin, A. W., and Epstein, J.I.:Correlation of serum prostate specific antigen and quantitative immunohistochemistry. J Urol.163: 1739-1742, 2000

39. Moody, D.B., Robinson, J.C., Ewing, C.M., Lazenby, A.J., Issacs, W.B. Interleukin-2 transfected prostate Cancer Cells Generate a Local Antitumor Effect in vivo. Prostate.; 24 (5): 244-251, 1994

40.Lucey, D. R., Clerici, M., Shearer, G.M.: Type 1 and type 2 cytokine dysregulaion in human infectious, neoplastic and inflamatory diseases. Clin Microbiol Rev 9:532-562,1996)

41. Sato, M., Goto, S., Kanemko, R., et al: Impaired production of Th1 cytokines and increased frecuency of Th2 subsets in PBMC from advanced cancer patients. Anticancer Res18:3951-3956,1998

42. Naithon, J., Belldegrun A.: Gene therapy the future is here. J. Urol 51: 367-380, 1998

43. Vieweg, J., Rosenthal, F.M., Bannerji R.: Immunotherapy of prostate cancer in the Dunning rat model: Use of cytokine gene modified tumor vaccines. Cancer Res 54:1760-1765,1994