

11246



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
DEPARTAMENTO DE UROLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
"SALVADOR ZUBIRAN"

22

CUANTIFICACION DEL NUMERO DE CELULAS POSITIVAS CONTRA
INTERLEUCINA-2 EN TEJIDO PROSTATICO DE 58 PACIENTES
SOMETIDOS A BIOPSIA EN EL SERVICIO DE LITOTRIZIA DEL INCMNSZ

T E S I S

QUE PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD EN

U R O L O G I A

P R E S E N T A

JORGE ALBERTO SANCHEZ MONTIEL

Tutor: Dr. Fernando B. Gabilondo Navarro

Cotutor: M. C. Víctor Figueroa Granados



298426

INCMNSZ

México, D. F.

Septiembre del 2001



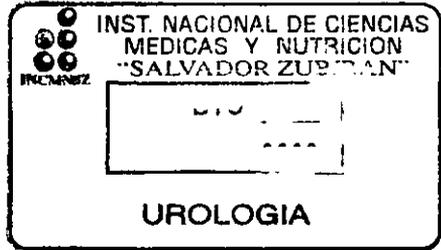
UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

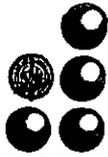
Handwritten signature



Handwritten signature



SUBDIVISION DE ESPECIALIZACION
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U. N. A. M.



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
"DR. SALVADOR ZUBIRAN"
DIRECCION DE ENSEÑANZA
México, D.F.

A Dios...

A mis Padres con amor y agradecimiento.

A mi esposa Maribel por su incomparable amor y por hacerme inmensamente feliz.

A mis hijos Juan Pablo y Regina por hacerme inmensamente feliz.

A mis hermanos , sobrinos, suegros, cuñados y concuños con cariño.

A la Sra. Doña Consuelo de la Garza Evia de Santos Q.E.P.D. por su extraordinario apoyo , ejemplo, y por enseñarme a ayudar a los más necesitados.

A mi Amigo Dr. Hernán Vaca Noriega Q.E.P.D. por su dedicación ejemplar, profundo sentido de responsabilidad, entrega a la vocación médica y gran amistad.

A mi amigo Dr. Carlos Guillermo Villarreal Villarreal Q.E.P.D. por su ejemplo, gran amistad y por entregar su vida en servicio de los demás.

A mis maestros y amigos Dr. Jorge Elías Dib, Dr. Fernando Gabilondo Navarro, Dr. Jorge Kasep Bahena, Dr. Guillermo Feria Bernal, Dr. Mariano Sotomayor de Zavaleta y Dr. Sebastián Zepeda Contreras por su apoyo y sus enseñanzas... mi más profundo agradecimiento.

A mis amigos por su lealtad.

A mis amigos residentes por su ayuda.

A todos nuestros pacientes, mi agradecimiento por siempre.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente la valiosa colaboración del CONACYT y SSA. Así mismo a los doctores Víctor Figueroa, Antonio R. Villa, Rogelio Hernández, Armando Méndez, Gloria Barrera y Kutzi Ariaga por su ayuda respecto a los anticuerpos monoclonales, secundarios y equipo necesario.

El más especial agradecimiento al Dr. Fernando Gabilondo Navarro Profesor Titular y Jefe del Departamento de Urología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición " Salvador Zubirán " por su invaluable apoyo, ejemplo de ética intachable, de calidad humana y profesional, por su profundo amor a México, y por estar trascendiendo a través de la semilla sembrada en cada uno de los que hemos recibido sus enseñanzas y formación.

LISTA DE ABREVIATURAS

AP	Adenosis Prostática
APE	Antígeno Prostático Específico
APC	Célula Presentadora de Antígeno
BTRPUS	Biopsia Trans Rectal de Próstata guiada por Ultrasonido
CaP	Cáncer de próstata (para fines de este estudio, siempre es adenocarcinoma)
CTL	Linfocito T citotóxico
Fas (CD95)	Proteína de superficie que estimulada específicamente desencadena muerte celular programada
HP	Hiperplasia Prostática
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán , México Distrito Federal
INF γ	Interferón gama
IL2, IL1, 4,	Interleucinas 2,1,4,
Inhibidor LH RH	Inhibidor del factor de liberación de hormona luteinizante
IHQ	Inmunohistoquímica
LAK (células)	Células citocidas activadas por linfocinas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA m	Ácido Ribonucléico mensajero
Th1, Th2	Patrón de colaboración T del tipo 1 y 2
TIL	Linfocitos infiltrantes de tumor
TCR	Receptor de células T
TGF β	Factor de Crecimiento transformante beta

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

TABLA 1. Características generales de los 58 pacientes incluidos en el estudio.

FIGURA 1. Ejemplos representativos de la determinación por inmunohistoquímica de la reactividad contra IL-2 en las células de lesiones neoplásicas de próstata.

TABLA 2. Variables celulares mediadas por medio de un lector automatizado.

FIGURA 2a. Proporción del número de células positivas entre el total de células para la inmunotinción anti-IL-2 en el tejido prostático con adenocarcinoma.

FIGURA 2b. Gráfico tipo Box-plot que ilustra el promedio de proporción del número de células positivas entre el total de células positivas a anti-IL-2 en el tejido prostático con adenocarcinoma.

TABLA 3. Distribución de los sujetos estudiados en cada uno de los estratos de células positivas.

TABLA 4. Resultados del análisis de correlación en CaP entre pares de una variable celular y otra variable con valor pronóstico.

RESUMEN

Objetivo : La proliferación y maduración de las células del sistema inmunológico es altamente influenciada por las citocinas del tipo de la interleucina 2 (IL-2), una citocina Th1(T cooperadora tipo 1). Sus efectos sobre el crecimiento y diferenciación de las células del cáncer de próstata se están estudiando actualmente, sin embargo no tenemos conocimiento de que se haya comparado nunca el número de células inmunorreactivas contra esta citocina en el tejido prostático humano.

Material y Métodos: De entre 171 pacientes que acudían al servicio de Urología se seleccionó al azar a 58 sujetos con diagnóstico histológico de adenocarcinoma de próstata. En cuyo tejido se midió el número de células inmunorreactivas contra IL-2 en los espacios periglandulares. Se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) estándar en los especímenes mediante la aplicación de anticuerpos monoclonales contra IL-2 (Genzyme inc, Boston, Mass.). Se digitalizaron y entonces se analizaron las imágenes a color de las laminillas teñidas por IHQ contra IL-2 usando para tal efecto un analizador comercial (Qwin Leica). Se amplificó a 400x y entonces fueron seleccionadas las imágenes de las glándulas representativas de cada espécimen. Se cuantificó automáticamente el número de células positivas contra IL-

Resultados: La positividad en todos los casos con adenocarcinoma se midió y fue baja. El antígeno prostático específico (APE) no correlacionó significativamente con el grado de positividad contra IL-2, pero el grado de desdiferenciación histológica del CaP (Gleason) sí correlacionó significativamente (Coeficiente de correlación de Spearman , $r = - 0.3$, $r = - 0.6$ respectivamente).

Conclusiones: El número de células inmunorreactivas a IL-2 en el infiltrado inflamatorio localizado alrededor de las glándulas prostáticas cancerosas parece escaso para lo que esperaríamos por el número de linfocitos en dicha glándula. Tal observación pudiese ser una de las causas de inmunovigilancia defectuosa que favorezca la progresión del adenocarcinoma de próstata, o puede ser una consecuencia del cáncer sobre el sistema inmunológico. Por lo tanto, es importante esclarecer si existe disminución en la cantidad de células positivas a IL-2 en el tejido prostático con CaP y compararlo con otras entidades.

ABSTRACT

Purpose: Proliferation and activation of the immune cells that recognize 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 immuno-reactive cells in specimens of human prostatic adenocarcinoma (CaP) has not been previously determined.

Materials and methods: We randomly selected the prostatic specimens of 58 CaP, from the same number of patients attending the Urology service of the INCMNSZ, México. The number of IL-2 immuno-reactive cells located in the periglandular spaces was determined in the periglandular spaces. Standard immunohistochemistry staining technique was applied to specimens using monoclonal antibodies to IL-2 (Genzyme Inc, Boston, Mass.). Color images of IL-2 immuno-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. Only the IL-2 positive cells in the periglandular stroma were counted. The glandular elements and the luminal areas were excluded from analysis.

Results: The number of IL-2 immuno-reactive cells in cancer specimens seem to be low $3.72(\pm 2.76)$. There was also a statistically 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 prostate specific antigen (PSA) did not significantly correlate with the cell positivity (Spearman $r = -0.3$).

Conclusions: The apparently low number of IL-2 immunostained cells observed in CaP specimens could be one of the immune evasion mechanisms in prostate cancer. This could be one of the causes of impaired locally immune protection against tumor. It will be necessary to elucidate it by comparing the number of IL-2 positive cells observed in CaP versus benign conditions.

INDICE DE CONTENIDO

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Lista de abreviaturas	iv
Lista de figuras y tablas	v
Resumen	vi
Abstract	viii
Índice de contenido	x
I. Marco teórico	
Introducción	11
Antecedentes	16
II. Justificación	18
III. Objetivos	19
IV. Hipótesis	20
V. Material y métodos	
Diseño del estudio	21
Tamaño de la muestra	21
Población de estudio	22
Criterios de inclusión	22
Criterios de exclusión	22
Esquema de muestreo	22
Esquema de seguimiento	23
Técnica de Inmunohistoquímica	23
Consideraciones éticas	25
Descripción del procedimiento	25
VI. Definiciones operacionales	26
VII. Análisis estadístico	30
VIII. Resultados	31
IX. Discusión	42
X. Conclusiones	48
XI. Apéndices	
Hoja de recolección de datos	50
Flujograma	52
Clasificación del estado clínico en CaP	53
Método de Inmunohistoquímica	54
Escala de Gleason	56
XII...Referencias	57

I. MARCO TEORICO

INTRODUCCIÓN

El adenocarcinoma de próstata (CaP) es una entidad que presenta una incidencia de hasta 400,000 nuevos casos por año y es el noveno cáncer más frecuentemente diagnosticado en el mundo. La mortalidad ocasionada por esta neoplasia es también elevada.¹

El antígeno prostático específico (APE) se utiliza actualmente como prueba de escrutinio diagnóstico y en combinación con el tacto rectal permite sospechar tempranamente esta neoplasia. Una elevación significativa del APE puede preceder hasta con cinco años a la presentación de cualquier síntoma relacionado con el CaP.

El procedimiento utilizado actualmente para confirmar o descartar la neoplasia es la biopsia transrectal de la próstata (BTRP) que mediante el ultrasonido (BTRPUS) ha permitido esclarecer la utilidad del APE en los diferentes grupos de riesgo para CaP. Según otros estudios en un tercio de los sujetos mayores de 60 años sin prostatitis y que cursan con elevación del APE, presentarán al menos un foco con CaP en el tejido prostático biopsiado.

Uno de los graves problemas de la detección temprana del CaP es el carácter casi impredecible de su evolución.² Ese hecho justifica la todavía intensa búsqueda de marcadores del pronóstico para la evolución del adenocarcinoma de próstata.

ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS

A pesar de una mayor detección en estadios tempranos del CaP, sigue existiendo una gran cantidad de sujetos que mueren por estadios avanzados de la enfermedad. Así la detección temprana del CaP no ha tenido aún impacto en la sobrevida específica de esta neoplasia;³ pues hasta hoy no existe ningún tratamiento curativo para el CaP metastásico.

Aunque la enfermedad localizada es potencialmente curable mediante prostatectomía radical o radioterapia, al menos un tercio de los pacientes sometidos a prostatectomía radical serán post quirúrgicamente estadificados como enfermedad no confinada al órgano. Hasta un 61% de las biopsias prostáticas de control en los pacientes que se sometan a radioterapia radical tendrán todavía CaP. ^{4, 5} Por lo tanto, una significativa proporción de pacientes tratados con intento curativo quedan con tumor residual ⁶ y en ellos tampoco se ha demostrado beneficio ni con el tratamiento adyuvante.

La deprivación androgénica ha sido importante parte del tratamiento del CaP metastásico ⁷. A pesar del uso de tales tratamientos muchos pacientes muestran progresión de la enfermedad a dos años. Una vez que es detectada la resistencia, la sobrevida alcanzará difícilmente 3 años ⁸.

Con base en lo anterior, es necesario buscar otras modalidades terapéuticas para el CaP. Algunas evidencias sugieren que el propio sistema inmunológico tendría gran importancia en el tratamiento del CaP metastásico. Debido a la relativamente lenta progresión de esta enfermedad, tiene importancia correlacionar la IL-2 con un cierto grado de supresión que han sugerido diversas observaciones en el CaP humano ⁹.

LA INMUNIDAD FRENTE AL CANCER

Los tumores malignos expresan antígenos que pueden estimular y actuar como blancos para la inmunidad antitumoral. ¹⁰⁻¹¹. Los tumores pueden expresar también antígenos de diferenciación tisular ¹². Muchos otros mecanismos inmunológicos efectores son capaces de destruir células tumorales ¹³.

Para el tumor existen mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria, un ejemplo es la pobre inmunogenicidad de tales tumores debido a la falta de coestimuladores, su incapacidad para estimular a las células T cooperadoras restringidas por el MHC de clase II o la ya conocida regulación negativa de las moléculas MHC. Es igualmente importante la inducción de tolerancia a los antígenos del tumor que la inmunosupresión del huésped.

El tratamiento de los tumores a través de estrategias inmunológicas no ha tenido aún éxito ¹⁴, tampoco la inmunoterapia ni el tratamiento con citocinas.

Las evidencias a partir de modelos animales sugieren que, en los tumores sólidos comunes, la inmunidad antitumoral es mediada principalmente por las células T ¹⁵. Pero el reconocimiento de las células cancerosas como cuerpos extraños depende también de la expresión de antígenos tumorales específicos y de la expresión de moléculas codificadas por el complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) conocidas en algún momento como antígeno leucocitario humano (HLA).

El papel central de las células T está dado por un receptor (TCR) en su superficie que reconoce específicamente a los complejos MHC / antígeno. La activación del TCR resultaría así en la muerte de las células tumorales que expresaran el antígeno blanco ¹⁶.

RELACION ENTRE EL ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA Y LA INMUNIDAD

El sistema inmunitario podría eliminar células malignas recientemente transformadas ¹⁷. Dicha idea se sustenta también en la llamada "regresión espontánea", que asume que el sistema inmunitario ha sido capaz de retardar la progresión tumoral y hasta eliminar el tumor por completo. No han sido reportadas regresiones espontáneas en el CaP ¹⁸. Esto se explicó

falsamente en su supuesta pero falsa carencia de linfáticos ¹⁹, ahora se sabe que en dicha glándula se puede reproducir una respuesta inflamatoria completa. ^{20, 21}

Recientemente se ha sugerido la densidad de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) es un factor pronóstico que independientemente del grado del tumor predice la progresión en las neoplasias. ²²

Hemos observado que los pacientes con CaP metastásico tienen defectos en la inmunidad celular ²³ y niveles bajos de producción de INF- γ .²⁴ Así mismo es conocido que el CaP puede evadir la detección por el sistema inmunitario, mediante la presentación defectuosa de antígenos. ²⁵

Un defecto de expresión de MHC-I se presentó en el 40% de los CaP primarios y hasta en un 80% de las metástasis linfáticas. ²⁶

Los anteriores hallazgos, entre otros muchos, pueden explicar porqué algunos CaP que progresan producen una escasa estimulación de las células inmunitarias. Sin embargo otros mecanismos de escape inmunológico mejor conocidos pueden ser igual o más importantes que los anteriores^{27, 28} ; la transcripción anómala de la información en los linfocitos T ²⁹ y la idea de que las células tumorales pueden inducir la apoptosis de las TIL que expresen el Fas. ³⁰

ANTECEDENTES

La interleucina-2 (IL-2) fue la primera de todas las citocinas en ser descubierta ³¹ y descrita. Es una proteína de 15.5 kD que juega un papel central en la regulación inmunitaria, en el humano tiene 133 aminoácidos con diferentes grados de glucosilación ³². La IL-2 se secreta principalmente por los linfocitos T activados maduros, dicha activación de linfocitos por antígenos específicos resulta también en la generación de receptores de IL-2 (IL-2R) en su propia superficie. La subsecuente interacción del IL-2R del linfocito con la IL-2 conduce a la proliferación celular resultando en una respuesta inmunitaria eficiente. ³³

De acuerdo con la nomenclatura de las citocinas actualmente en uso ³⁴, la IL-2 es una citocina característica del patrón de colaboración T del tipo 1 (Th1) inductora y participante de una fuerte respuesta inmunitaria. Mientras que una respuesta Th 2 se caracteriza por antagonizar a la respuesta de inmunidad celular.

Recientemente se demostró que los pacientes con CaP avanzado, tienden a tener un perfil predominantemente dominado por las citocinas de tipo Th2 y mayor cantidad de células secretoras de IL-4. ³⁵

Las citocinas Th1 y Th2 son antagónicas entre sí y deben inducirse en situaciones diferentes. Su inducibilidad tiene un alto valor predictivo de remisión-recaída (97%) del cáncer de células transicionales tratado con BCG y tiene valor pronóstico independiente. ³⁶

Si la inducción de RNAm de una citocina Th1 tiene valor predictivo de evolución, entonces la presencia de proteína citoplásmica (IL-2) reviste un especial interés. 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 este trabajo fue cuantificar el número de células positivas a IL-2 en los tejidos con cáncer de próstata (CaP).

II. JUSTIFICACIÓN

El CaP es un grave problema de salud mundial. Una de las estrategias promisorias para su tratamiento es la inducción de modificaciones en la inmunidad antitumoral. Cada día hay mayor número de reportes de la utilidad de la IL-2 en forma de inmunoterapia y terapia génica.

Sin embargo, hasta hoy la medición del número de células positivas a IL-2 por IHQ en el tejido prostático humano no ha sido descrita, ni se ha estudiado la relación entre esta citocina en los tejidos y el Gleason como factor pronóstico de evolución en el CaP.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Cuantificar el número de linfocitos positivos a IL-2 por el método de IHQ en el tejido prostático parafinado humano en especímenes con adenocarcinoma biopsiados en el servicio de litotricia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Comparar la frecuencia e intensidad de la inmunotinción para 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.- Buscar asociación entre las etapas clínicas mayores del CaP al momento del diagnóstico histopatológico con una menor* frecuencia e intensidad de detección para la IL-2.
- 4.- Buscar asociación entre la suma de Gleason 7 ó mayor del adenocarcinoma al momento del diagnóstico histopatológico con una menor* frecuencia e intensidad de detección de la IL-2.
- 5.- Buscar asociación entre la evolución favorable (vivo libre de actividad) a 24 meses del momento del diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma y una mayor* frecuencia e intensidad de detección de la IL-2.

IV. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERAL

1.- La prevalencia de detección positiva de IL-2 es menor* en los linfocitos presentes en los tejidos con CaP.

HIPÓTESIS SECUNDARIAS

1.- 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 diagnóstico 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 diagnóstico histopatológico con la frecuencia e intensidad de detección positiva de IL-2 en el tejido prostático.

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

* *operacional*

V. MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Retrospectivo, descriptivo de una serie de casos.

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 inducibilidad del 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 con datos de mal pronóstico la estimamos en 5 % (0.05), y para los sujetos con datos de buen pronóstico la prevalencia esperada de positividad la calculamos en 29% (0.29). Utilizamos Z_{α} de 0.05 y Z_{β} de 10.

Calculamos con el programa Epidat ®³⁷ que con un tamaño de muestra de 58 casos, podíamos comprobar las hipótesis establecidas usando como prevalencia de expuestos y no expuestos (0.05) y (0.29) respectivamente.³⁶ Con un nivel de significancia estadística de 0.05 y un poder estadístico de 90% . La razón de momios mínima esperada fue de 2.0.

POBLACIÓN DE ESTUDIO:

Todos los sujetos masculinos que como casos consecutivos y registro en nuestro hospital acudieron de enero de 1994 a enero de 1998 a la Clínica de Litotricia del Servicio de Urología del INCMNSZ a realizarse la biopsia transrectal de próstata guiada por ultrasonido.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- 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.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- 1.- Historia 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.

ESQUEMA DE MUESTREO

Los pacientes se identificaron en el momento en que ya se había establecido el diagnóstico de rutina por medio de BTRPUS realizada en el Servicio de Litotricia del Departamento de Urología del INCMNSZ de acuerdo con sus 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 el diagnóstico histológico de CaP. 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 (Apéndice 1) 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.

TÉCNICA DE IHQ : se describe en el apéndice 4.

CONTEO CELULAR. Utilizando un sistema automatizado de análisis de imágenes (Qwin Leica, Milton Keynes, U. K.), se cuantificó el número de células inflamatorias y el número de linfocitos inmunorreactivos a IL-2

localizados en el tejido estromal en torno a las glándulas neoplásicas de la próstata (Figura 1). El sistema de cuantificación de células inmunorreactivas ya ha sido descrito ³⁸. 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 al azar con un aumento de 400x se realizaron bajo la supervisión de un solo observador que permaneció cegado a los datos clínicos.

VARIABLES CELULARES. Los promedios de las cuentas de células anti IL-2 positivas (Prom. Num. Cel. Pos.) y anti IL-2 negativas (Prom. Num. Cel. Neg.) de cada uno de los 58 especímenes estudiados fueron utilizados para crear dos nuevas variables como se indica en la Tabla 1.

ESTRATEGIAS DE SORTEO

El tejido prostático parafinado de todos los sujetos elegibles 171 (58 CaP) que reunían los criterios de inclusión se sortearon de acuerdo con tablas de números aleatorios. Cegamiento; con un orden aleatorio y de manera ciega a los datos clínicos se realizaron partidas de 10 laminillas por día para IHQ 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.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Al paciente que ya había otorgado su CONSENTIMIENTO INFORMADO para la realización del procedimiento diagnóstico, ya no se le solicitó nuevamente, pues el presente estudio se realizó en el tejido parafinado residual de la rutina diagnóstica.

La determinación de IL-2 en el tejido prostático parafinado no implicaba ningún RIESGO ni COSTO adicional para el paciente, pero sí el BENEFICIO adicional de una segunda revisión de su caso por otro patólogo experto. Los miembros del comité de ética en investigación del INCMNSZ recibieron una copia de este protocolo. La información obtenida en este estudio quedó sometida a las normas que rigen la investigación en humanos y no podrá ser utilizada fuera de tales estatutos.

DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTO

En la hoja de recolección de datos (apéndice 1) fueron evaluadas las siguientes variables: a) Diagnóstico histopatológico b) Nivel de APE sérico por Radioinmunoanálisis (*CIS Bio International, Cedes France). Éste 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 Memorial Sloan Kettering Cancer Center (Apéndice. 3) y el grado de diferenciación de la neoplasia según la clasificación de Gleason (Apéndice 4). 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 i). Historia de bloqueo androgénico total o parcial, farmacológico o quirúrgico. j) Estado en la última consulta.

VARIABLE DEPENDIENTE

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

VARIABLE CONFUSORAS

Edad al momento del diagnóstico histológico en el tejido prostático.

VI. DEFINICIONES OPERACIONALES

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

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 de próstata. 2.- Para la correlación clínica; si aportó datos clínicos como estadio, comorbilidades, extensión de la enfermedad, uso de inmunosupresores,etc., como se registra en la hoja de captura de datos (Apéndice 1).

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 i). Historia de bloqueo androgénico total o parcial, farmacológico o quirúrgico. j) Estado en la última consulta.

VARIABLE DEPENDIENTE

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

VARIABLE CONFUSORAS

Edad al momento del diagnóstico histológico en el tejido prostático.

VI. DEFINICIONES OPERACIONALES

BLOQUEO ANDROGÉNICO

a) Quirúrgico.- Se refiere a orquitectomía bilateral.

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

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 de próstata. 2.- Para la correlación clínica; si aportó datos clínicos como estadio, comorbilidades, extensión de la enfermedad, uso de inmunosupresores, etc., como se registra en la hoja de captura de datos (Apéndice 1).

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

DEFINICIÓN DE ENFERMEDAD. Se clasificó como portador de CaP 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.

ESCALA DE GLEASON. Clasificación histológica del grado de diferenciación de un adenocarcinoma de próstata (Apéndice 5) .

ESPECTRO PATOLÓGICO. Los hallazgos histológicos fueron desde hiperplasia benigna hasta adenocarcinomas poco diferenciados. Pero podía existir inflamación que se dividió en dos grupos de interés: con infiltrado inflamatorio y sin infiltrado inflamatorio.

ESPECTRO CLINICO. Abarcó 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.

ESTADIO CLÍNICO. Se utilizó el método A,B,C,D según Withmore (Apéndice 3).

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

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 inmunotinción hasta obtener tinción positiva para el control interno.

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.

MAYOR REACTIVIDAD POSITIVA CONTRA IL-2. En referencia a nuestros primeros resultados, la definimos como la positividad para IL-2 por IHQ igual o mayor al 10% de la proporción células positivas/ positivas + negativas.

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

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

REACTIVIDAD POSITIVA CONTRA IL-2.

Técnicamente es 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.

Operacionalmente se consideró positivo un campo sólo si coexistían los siguientes 2 criterios:

- 1.- Al menos una célula positiva por campo seco fuerte en cualquiera de los 5 campos observados aleatoriamente (Leica Q Win 1998) 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 estudiar el mismo campo .

VII. ANALISIS ESTADÍSTICO

Estadística. El número de células IL-2 positivas fue cuantificado en todos y cada uno de los casos con CaP usando la prueba . 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 tener datos de mal pronóstico obtuvimos la razón de momios a través del exponencial de los coeficientes en un análisis de regresión logística. 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 logística 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 con un patólogo de referencia, obteniendo una alta concordancia ($\kappa = 0.97$).

Se evaluó el coeficiente de variación de la lectura manual entre observadores haciendo detecciones de IL-2 por IHQ que fueron valoradas por dos observadores independientemente y de manera ciega al diagnóstico e hipótesis de trabajo. Para el coeficiente intra observador se le dieron (8 especímenes) a un solo observador en dos tiempos distintos (los mismos casos), para que fueran leídas y se compararan resultados de cada tiempo (T estadística = 0.89).

Con respecto a la variación intraespecímen de la positividad a IL-2 entre las zonas con HP y CaP de un solo espécimen, fueron seleccionados niveles de un solo bloque que no tuvieran evidencia de CaP y una vez que el diagnóstico fuera dado por el patólogo de referencia, se leyeron por un solo observador cegado. Finalmente los promedios de esas lecturas fueron comparadas con las de verdaderas HP obteniendo una alta concordancia (T estadística = 0.91). El coeficiente de variación de las lecturas realizadas con el sistema Leica Q Win se midió por los mismos

procedimientos pero con los parámetros automatizados del mismo ($r = 0.99$).

Hallazgos clínicos y de laboratorio. Los pacientes con CaP presentaron edades que variaron de 52 a 89 años (71 ± 8.7). El tiempo de seguimiento en los pacientes con CaP fue 1.7 ± 1.1 años. Los resultados de las otras variables tales como edad, peso, IMC (índice de masa corporal), talla y valores de laboratorio se describen también (Tabla 1).

Era obvio que los pacientes al tener cáncer tendrían un APE total en suero significativamente alto (49.5 ± 70.9). El seguimiento por 1.75 ± 1.13 años indica buen apego a la consulta externa. El peso máximo se tomó como una medida de sobrepeso histórico.

Variable estudiada	CaP n=58 Prom., D. S.
Edad (años)	71.2, 8.7
Seguimiento (años)	1.75, 1.13
Peso (kg)	69.6, 12.0
Estatura (m)	1.7, 0.07
IMC	25.0, 3.8
Peso Max. (kg)	77.7, 13.4
Colesterol (mg/dl)	183.7, 44.9
Triglicéridos *	141.8, 40.0
APE (ng/dl)	49.5, 70.9

*3 datos faltantes.

Tabla 1. Características generales de los pacientes incluidos

Evaluación histológica. El grado histológico del adenocarcinoma de próstata se estableció de acuerdo con la escala de desdiferenciación de

Gleason (Apéndice 5), 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 clínico del grupo CaP se estableció en la forma convencional (Apéndice 3) en cada uno de los 58 (100%) casos, como sigue; A 12 (20.7%), B 17 (29.3%), C 2 (3.4%), D 27 (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, las biopsias prostáticas tenían diferentes cantidades de epitelio benigno hiperplásico. (Figura 1A).

Medición de IL-2 tisular. Se evidenció que la próstata humana con CaP tiene una relativa baja cantidad de células inmunopositivas a IL-2 que lo observado en otros tejidos. Según lo medido por IHQ, en los espacios periglandulares el número de células positivas para IL-2 en especímenes con CaP gira entre $(4 \pm 2.7$ células). Las células IL-2 negativas fueron de 118 ± 44.0 aún en presencia del CaP .

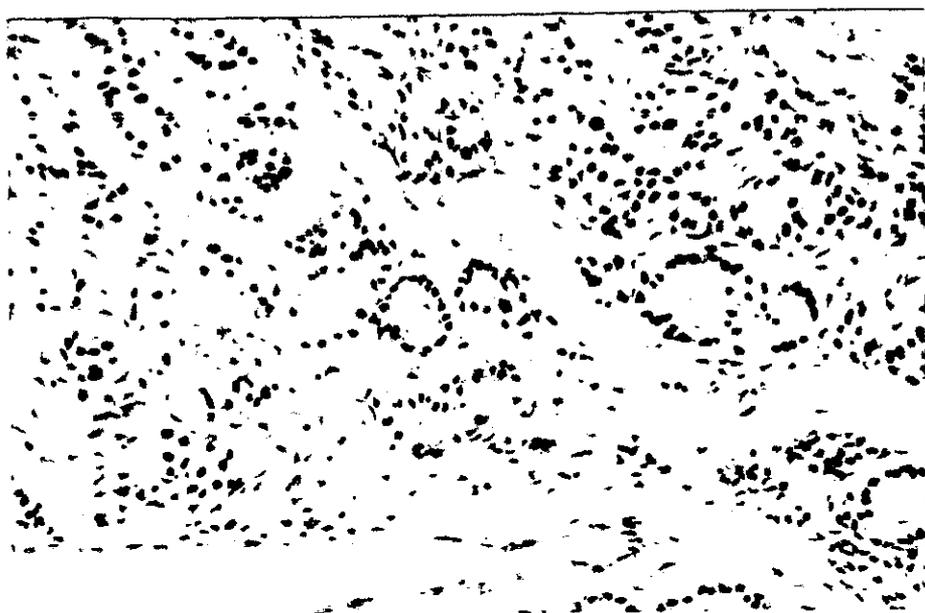


Figura 1.- Ejemplos representativos de la determinación por inmunohistoquímica de reactividad para IL-2 en las células de lesiones neoplásicas de próstata. Pocos linfocitos inmunoreactivos contra IL-2 (flecha) se localizan contiguos a zonas de adenocarcinoma (x200).

Los especímenes presentaron características muy importantes (Tabla 2). La celularidad fue escasa en CaP (73 ± 23.6), pero sólo algunas de esas células pudieran identificarse como linfocitos T no activados. Sin embargo la gran mayoría de esas células correspondieron con elementos del infiltrado inflamatorio periprostático. Es decir, células estromales y las propias células neoplásicas, característica presente en CaP .

El conteo manual de células positivas IL-2 fue en promedio 3.7 ± 2.7 linfocitos positivos, en contraste lo medido por el sistema automatizado fue 4.0 ± 2.7 células positivas. Sin embargo no existió diferencia estadísticamente significativa entre la lectura manual y la automatizada para CaP . Lo que significa que casi el 100 % de las células positivas a IL-2 eran linfocitos activados y que muy pocas de las células negativas fueron linfocitos T inactivos.

Tipo celular contado	CaP n=58 Prom, DS
Células Positivas	4.0 , 2.7
Células Negativas	118.0 ,44.0
Proporción Celular	3.4 , 2.6
Linfocitos Positivos	3.7 , 2.7

Tabla 2. Resultados de la tinción por Inmunohistoquímica para IL-2. La celularidad fue medida por un lector automatizado en tres variables (Células Positivas, Negativas y Proporción celular) y manualmente en una variable (Linfos Positivos). En cada uno de los 58 especímenes analizados se cuantificaron cinco campos de cada laminilla .

En los especímenes estudiados el Promedio de las Proporciones Celulares (Prom. Prop. Cel.) fue también relativamente bajo (Figura 2a) 3.4 ± 2.7 y 12.5 ± 4.6 para los grupos con CaP. Se puede notar que no existen valores extremos. Obsérvese que el valor aislado más alto de las proporciones celulares en el grupo con CaP no rebasa el valor de 10 (Fig 2a) y su mediana difícilmente llega a cinco .

Proporción Celular

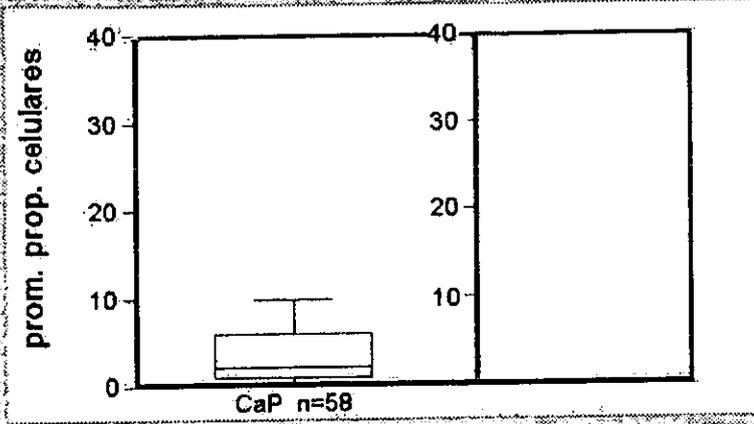


Figura 2a.- Proporción del número células positivas / positivas más negativas para la inmunotinción anti-IL-2 (unidades en el eje de Y). Cada punto en los especímenes de CaP (■), representa el promedio del número de células en 5 campos. La mediana se representa como línea horizontal.

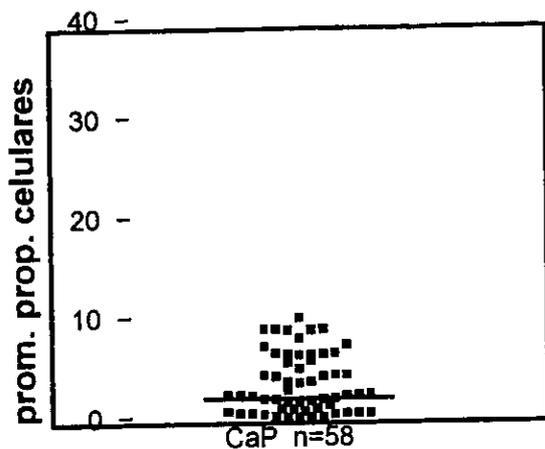


Figura 2b.- Promedio de las proporciones del número células positivas / positivas más negativas para la inmunotinción anti-IL-2 (unidades en el eje de Y). Los bigotes representan el intervalo mínimo y máximo para cada promedio grupal del número de células en 5 campos. Las cajas representan cuartiles 25 a 50 con su respectivo promedio .

Los 58 sujetos de CaP se distribuyen por cuartil de celularidad de la forma en que se observa en la Tabla 3. Puede notarse que la distribución de las células negativas por cuartiles va en sentido decreciente en la medida que aumenta el número de células del respectivo cuartil. Por ejemplo, 46.6 de los especímenes con CaP están en el cuartil delimitado por más de 9.4 células por campo.

Número de células	CaP n = 58(%)	Cuartil
0.0-1.8 células/ campo	27 (46.6)	Q1
1.9-5.5 células/ campo	24 (41.4)	Q2
5.6-9.3 células/ campo	7(12.1)	Q3
9.4-más células/ campo	0 (0.0)	Q4
Total	58(100)	116

Tabla 3. Distribución celular de los 58 especímenes de los sujetos estudiados (CaP) en cada uno de los cuartiles de células positivas. Se demuestra la ausencia de sujetos con CaP en el cuartil celular superior .

En un dispersograma en el que sólo aparecen los sujetos con CaP (Figura 3) se observó que la correlación negativa entre el número de células positivas (Prom. Num. Cel. Pos.) y la suma de Gleason aunque inicialmente significativa (Spearman = - 0.5, $p < 0.00001$), se incrementó importantemente al buscar la correlación entre el Prom. Propor. Cel. y la suma de Gleason, (Spearman = -0.7, $p < 0.00001$) como se ve en la Tabla 4. Pero cuando se usó el APE como variable independiente (Y), para correlacionarse con las variables previamente utilizadas (Prom. Num. Cel.

Pos y Prom. Propor. Cel), la correlación fue mucho menos importante como se puede ver en los renglones último y penúltimo de la Tabla 4. Así las varianzas explicadas del Prom. Num. Cel. Pos y del Prom. Propor. Cel. en el APE no fueron mayores 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 (Prom Propor Cel ó Prom. Num. Cel. Pos.) como variables dependientes y una variable con valor pronóstico; el antígeno prostático específico o la suma de Gleason (independientes, X).

Para aclarar que al menos una parte de los cambios en la proporción de células positivas a IL-2 podrían ser explicados por el grado de malignidad, obtuvimos un dispersograma de los 58 casos en los que se registró la suma de Gleason (Figura3). La correlación es claramente negativa por que los números de mayor peso específico, se distribuyen en esa dirección (línea que uniría las letras R-R). Sin embargo, parece claro que si los especímenes con HP se mostraran (Nótese que la HP no tendría Gleason) ocuparían la parte superior del dispersograma en lo que se refiere a la celularidad.

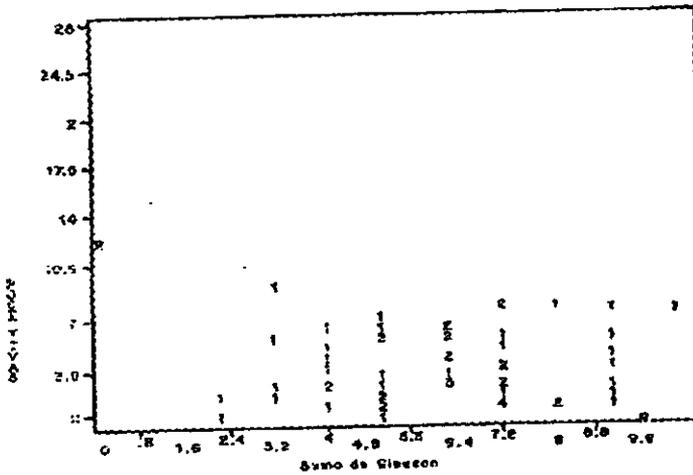


Figura 3. Dispersograma (SPSS/PC) que ilustra el coeficiente de Correlación de Spearman entre dos variables; Promedio de Proporción de Células (eje de Y) y la suma de Gleason (eje de X). Los números dispersos en el interior del recuadro representan el número de sujetos en esa determinada coordenada ($r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

IX. DISCUSIÓN

Por medio del presente estudio se ha demostrado claramente y por vez primera que algunas células presentes en el tejido prostático expresan la citocina IL-2. Para hacer esta descripción, fueron seleccionados especímenes prostáticos, de pacientes que resultaron con CaP. El promedio de edad rebasa a los cincuenta años y tal hecho no sorprende pues desde las primeras descripciones de la enfermedad, se sabe que el CaP se presenta con mayor frecuencia en pacientes de edad avanzada.³⁹ Así, resulta obvio que tendió a ocurrir una auto selección.

Llama la atención que se observara un corto seguimiento de los pacientes con CaP (1.75 ± 1.13). Se esperaría observar un corto seguimiento en un grupo con neoplasia maligna, pues debería significar *per se* una causa de muerte que sumada a la mayor edad de ese grupo significaría fin de seguimiento por muerte.

Antropométricamente la población no tenía sobrepeso al momento del diagnóstico, por el índice de masa corporal, peso corporal o talla.⁴⁰ Solamente el peso máximo referido por el paciente a lo largo de su vida, resultó ser significativamente diferente entre cuando se comparó con el peso al ingreso (*t* de Student para muestras pareadas, $p = 0.02$). Pero ni siquiera los grandes estudios epidemiológicos han podido confirmar a

alguna variable antropométrica como factor de riesgo independiente para el desarrollo de CaP. ⁴¹

Se esperaba que por ser sujetos con cáncer tuvieran alto el APE sérico lo cual fue corroborado en los resultados, lo que concuerda con estudios previos². En otro estudio nuestro por cada 1 ng/ dl de incremento en el APE sérico se incrementó 4 veces el riesgo de ser CaP con datos de mal pronóstico (1/R. M = 4.11, p = 0.02). (datos no mostrados).

Por otro lado, si como hemos observado en la tabla 4, a una menor celularidad positiva también correspondió un mayor APE sérico, (r = -0.3, p = 0.0008) ese resultado tiene la misma dirección que estudios previos. Por ejemplo administrando IL-2 a un cultivo de células de cáncer prostático humano, se ocasiona una importante disminución del RNAm del APE, reduciéndolo hasta cinco veces con respecto al valor basal. ⁴² 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 células productoras de APE. Resultará de gran interés el hacer doble marcaje en nuestros especímenes, sin embargo el APE tisular no es actualmente aceptado como marcador pronóstico en el CaP. ⁴³

El sistema inmunológico 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 inmunitario. Quizá la progresión esté relacionada con tales fallas, pues se ha demostrado que los pacientes con CaP avanzado tienen deficiencias en la inmunidad celular.²³ Los relativamente bajos niveles de IL-2 que se observaron en las próstatas no malignas podrían asociarse con el riesgo de desarrollar anomalías en la transducción de las células T²⁹ o quizá la mayor presencia de IL-2 estimule localmente la eliminación de los focos de neoplasia maligna.⁴⁴ La IL-2 es una citocina que por lo tanto tiene acción local. Igualmente una célula inmunopositiva a IL-2 debe tener un radio de acción localmente limitado para cumplir con sus funciones de prevención de anomalías en la transcripción de las células T locales²⁹ y favorecer la expresión de MHC-I entre otras. Por ejemplo en el estudio de Sokoloff y cols.⁴² la administración de IL-2 produjo en células de adenocarcinoma prostático el aumento en la expresión de MHC-I. Cada vez que se incrementa el número de células IL-2 negativas en torno a los TIL u otras células positivas a IL-2, la eficacia de tales células para realizar sus funciones antineoplásicas debe verse disminuida. Por lo tanto, era importante estudiar también la proporción de células positivas con respecto al total de las células en el tejido (Prom. Prop. Cel.), pues sólo así se obtendría una estimación del número de células con las que una célula IL-2 positiva interactúa para cumplir sus funciones en la inmunidad contra el CaP.

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 también con pronóstico, pues la ausencia de ellos o su baja cantidad en el adenocarcinoma prostático se asocian con un mayor riesgo de progresión tumoral, así el número de TIL es un factor pronóstico ²² en sentido inverso al Gleason. Es muy probable que algunas de las células que en el presente estudio se encontraron en los especímenes con CaP sean TIL y así se explique también que exista correlación negativa entre Prom. Num. Cel. Pos. y la suma de Gleason ($p < 0.00001$). Esta relación será de gran interés dado que la suma de Gleason es un marcador pronóstico ampliamente conocido y validado.

Como se comentó, algunas líneas celulares obtenidas a partir de adenocarcinoma de próstata metastásico humano tienen alteraciones moleculares que conducen a la expresión defectuosa del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) en la superficie celular ²¹ y dicho defecto se corrige en presencia de algunas citocinas. ⁴² Puesto que otras citocinas, como $INF\gamma$ y $TNF\alpha$, favorecen la expresión del complejo MHC-I unido al antígeno y su interacción con los linfocitos T citotóxicos, entonces es posible que la falla en la respuesta inmunitaria celular observada en los pacientes con CaP pueda ser secundaria entre otras a una deficiente

presentación del antígeno tumoral, baja producción local de citocinas o ambas.

Con respecto a una posible y relativamente baja producción de citocinas Th1 en los pacientes con CaP, se ha demostrado que existe una menor producción de INF γ por los linfocitos de sangre periférica después de estimulación con mitógenos cuando dichas células provienen de pacientes con CaP.²⁴ 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.³⁵ Esto armoniza con la descripción de un patrón de citocinas Th2 sobre el Th1 en varias neoplasias⁴⁵ y la disfunción de las respuestas Th1 que conducen al desbalance de la proporción Th1/Th2 en los pacientes con cáncer avanzado.⁴⁶ El reconocimiento de ese defecto de citocinas Th1 en los sujetos con CaP se ha utilizado en el diseño de terapias antineoplásicas, tales como terapia génica.⁴⁷ De hecho, la inyección de células CaP previamente transfectadas con el gene de IL-2 destruyen tumores prostáticos subcutáneos en las ratas.⁴⁸ Así las células inmunopositivas podrían generar efectos antitumorales en el CaP⁴⁴.

X. CONCLUSIONES

Ésta es la primera demostración de que en el tejido prostático humano existen células inmunorreactivas para IL-2 detectadas por métodos de IHQ., al demostrar que el infiltrado de células positivas puede ser bajo 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 escaso en el CaP. Tal baja cantidad de linfocitos inmunomarcados para IL-2 podrían quizás ser una evidencia de su posible baja producción en dicha neoplasia maligna de la próstata.

El número de células positivas a IL-2 en un futuro podría quizá ser correlacionado con el pronóstico en CaP, pues se observó una correlación entre la suma de Gleason y el número de células IL-2 positivas.

Es de notar la dificultad que existe para encontrar el grupo adecuado para contrastar con los CaP de nuestro estudio, porque aunque la HP sea utilizada como control en la mayoría de los estudios del cáncer de próstata ⁵⁰ quizá como surrogado del tejido sano, dicha entidad histológica es también un estado de enfermedad caracterizado entre otros aspectos por la proliferación vascular.

GENERACIÓN DE HIPÓTESIS

No se puede afirmar que las cuentas relativamente bajas observadas sean inducidas o sean consecuencia de la neoplasia prostática. ⁵¹ para tal efecto deberán realizarse estudios de asociación genética.

Podemos definir que probablemente la positividad para IL-2 por IHQ igual o mayor al 10% de la proporción células positivas entre el total de células sea un punto aproximado de importancia para discriminar entre CaP y benignidad.

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.

Se deberá estudiar el grado de positividad a IL-2 por este método en tejidos sin CaP, dado que resulta prácticamente imposible encontrar controles con próstata normal, por la alta prevalencia de hiperplasia prostática en los adultos de todo el mundo y por las limitantes éticas para realizar biopsias en pacientes jóvenes.

XI. APÉNDICES

APÉNDICE I

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

CARCINOMA DE PRÓSTATA INCMNSZ

NOMBRE: _____ EDAD: _____
REGISTRO: _____ FECHA DE DIAGNÓSTICO: ____/____/____

- 1.- Co-Morbididades 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 () Índice tabáquico: años () No. de cigarrillos ()
6.- Cirugías previas: _____

7.- FECHA DE BIOPSIAS

- (1) ____/____/____ Dx: _____
8.- Dx. por BIOPSIAS Transrectales () a Transperineales () b
9.- HP ()
sin prostatitis () a prostatitis aguda () b
prostatitis crónica () c

10.-ADENOCARCINOMA ()

- sin prostatitis () a
con prostatitis aguda () b
con prostatitis crónica () c

- 11.- A-1: () A-2: () A-3: () A-4: () A-5: ()
12.- B-1: () B-2: () B-3: () B-4: () 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 () b₁
RETROPÚBICA () b₂
TRANSPERINEAL () b₃
c PROSTATECTOMÍA RADICAL () RETROPÚBICA () c₁
TRANSPERINEAL () c₂

17.- TRATAMIENTO

RTUP () a _____ OBSERVACIÓN () 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

1° campo (√) Positivos ()

2° campo (√) Positivos ()

3° campo (√) Positivos ()

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

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 óseo¹ ___/___/___ Dx: _____

b) Serie Ósea Metastásica¹ ___/___/___ Dx: _____

c) APE² último (en los 6 meses anteriores) FECHA ___/___/___ Valor _____

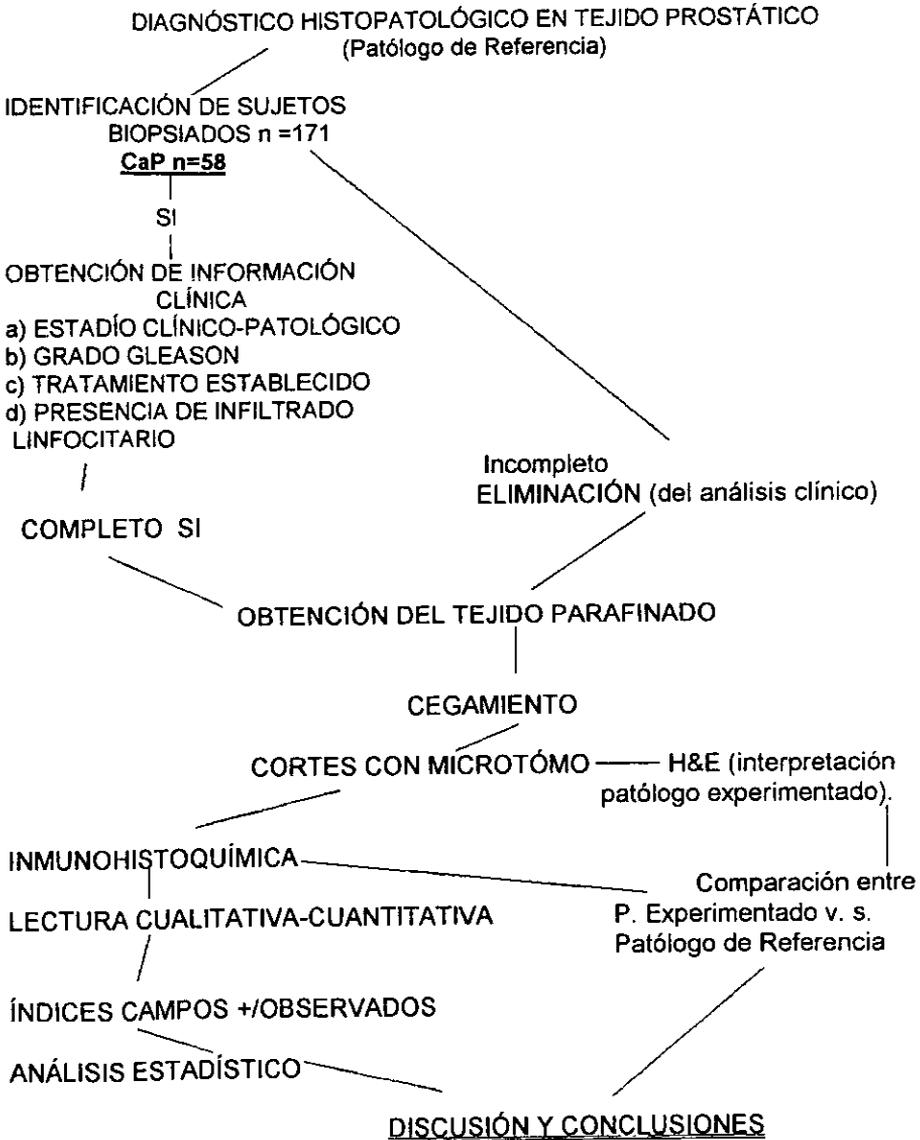
29.- OBSERVACIONES

¹ El último de los resultados obtenidos en los 6 meses anteriores a la fecha del diagnóstico histopatológico de novo

² El último resultado obtenido en los 6 meses anteriores o posteriores a la fecha del diagnóstico histopatológico.

APÉNDICE 2

FLUJOGRAMA



APÉNDICE 3 CLASIFICACIÓN DEL ESTADIO CLÍNICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA SEGÚN WHITMORE³

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

A1: Lesiones en menos del 5% del material revisado en patología con una suma de Gleason menor a 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 a 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 ganglios extrapélvicos o a distancia.

³ Manual para el tratamiento del cáncer Urogenital.

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 de 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 en solución de Metanol-H₂O₂ al 30%.
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 puede 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 al 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 hematoxilina).
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 observar al microscopio a 10x y 40x.

REACTIVOS.

a) Solución de: METANOL- PEROXIDO DE HIDROGENO(30% H₂O₂)

Metanol Absoluto (Merck-7210) _____ 80.0 ml

30% Peróxido de Hidrógeno _____ 7.0 ml

Agua Destilada _____ 13.0 ml

b) BUFFER DE FOSFATOS 0.5 M, pH 7.6

Fosfato de sodio, dibásico Na₂HPO₄ (sigma-50876) _____ 57.7 g

Fosfato de sodio, monobásico NaH₂PO₄ (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 % H₂O₂ _____ 40 ?l

APÉNDICE 5

ESCALA DE GLEASON

La escala de Gleason se basa en el grado de desdiferenciación histológica del carcinoma, cada región se califica de acuerdo a lo siguientes categorías:

- | | |
|--------------------------------|---------------|
| a.- bien diferenciado | Gleason 1 - 2 |
| b.- moderadamente diferenciado | Gleason 3 - 4 |
| c.- mal diferenciado | Gleason 5 |

SUMA DE GLEASON

La suma de Gleason es un constructo de la anterior escala histológica y se basa en la suma de los dos valores más altos de desdiferenciación obtenidos en la escala de Gleason, la suma se califica en una escala que va de 2-10 y se categoriza como:

- | | |
|--------------------------------|------------------------|
| a.- bien diferenciado | Suma de Gleason 2,3,4 |
| b.- moderadamente diferenciado | Suma de Gleason 5,6,7 |
| c.- mal diferenciado | Suma de Gleason 8,9,10 |

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 KEY: The cellular 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. Crawford, D.: Hormonal therapy of prostatic carcinoma: defining challenge. *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 prostate cancer. *Cancer* 66:1039-1044, 1990 (suppl 5).

9. Hrouda, D., Dalglish, A.G.: Gene therapy for prostate cancer. *Gene Therapy* 3:845-852, 1996.
10. Cheever, M.A., M. L. Disis., H. Bernhad, J.R., Gralow, S.L., Hand, E.S., Huseby., H.L. Quin., M. Takahashi, and W. Chen. Immunity to oncogenic proteins. *Immunological Reviews* 145:33-60,1995.
11. Boon, T. J., Cerottini, B., Vande Eynde, P., Van der Brugen and A. Van Pel. Tumor antigens recognized by T Lymphocytes. *Annual Review of Immunology* 12:337-365,1994.
12. Henderson, R.A., and O. J. Finn.: Human tumor antigens are ready to fly. *Advances in Immunology* 62:217-256,1996.
13. Hellstrom, K.E., I. Hellstrom., and I. Chen: Can co-stimulated tumor immunity be therapeutically efficacious? *Immunological Reviews* 145: 167-178,1995.
14. Lanzavecchia, A: Identifying strategies for immune intervention. *Science* 260:973-944,1993.
15. Greenberg, P. D.: Adoptive T cell therapy of tumors: Mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol* 49:281-355, 1991.
16. 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.
17. Burnet, F. M.: *Immunological Surveillance*.Oxford, UK; Pergamon,1970.

18. 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.
19. Smith, M.: The lymphatics of the prostate. *Invest Urol* 3:439-441, 1966.
20. Kelalis, P. P., Greene, L. F., Harrison, E. G.: Granulomatous prostatitis. *JAMA* 191:111-113, 1965 .
21. Neaves, W., Billingham, R.: The lymphatic drainage of the rat prostate and its status as an immunologically privileged site,. *Transplantation* 27:127-132, 1979.
22. Vesalainen, S., Lipponen, P., Talja, M., and Syrjänen, K.: Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 30A:1797-1803, 1994.
23. Schellhammer, P. F., Bracken R. B., Bean R. B.: Immune evaluation with skin testing. *Cancer* 38: 149-156, 1976 .
24. Elssasser-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.
25. 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.
26. 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.
27. Mukherji, B., Chakraborty, N. G.: Immunobiology and immunotherapy of melanoma. *Curr Opin Oncol* 7:175-184, 1995.
28. 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 immunosuppression. *J Immunol* 148:277-284, 1992.
29. 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.
30. 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.
31. 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.

32. Théze, J., Alzari, P., Bertoglio, J.: Interleukin-2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunol. Today*; 17:481-486, 1996.
33. Smith, K. A.: Interleukin-2 inception, impact and implications. *Science* 240:1169-1176, 1988.
34. Clerici, M., and Shearer, G. M.: The Th1/Th2 hypothesis of HIV infection; new insights. *Immunol. Today* 15:575-581, 1994.
35. 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.
36. 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.
37. Schlesselman, J. Z.: *Case-Control Studies. Design, Conduct, Analysis.* Oxford University Press, 1982.
38. 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.
39. 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.

40. Mills, P. K., Beeson, L., Phillips, R. L., and Fraser, G. E: Cohort Study of diet, lifestyle, and prostate cancer in adventist men. *Cancer* 64:598-604, 1989.
41. Whittemore, A. S., Kolonel, N. K., Wu, A. H., John, E. M., Gallagher, 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
- 45.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.

46. Sato, M., Goto, S., Kanemko, R., et al: Impaired production of Th1 cytokines and increased frequency of Th2 subsets in PBMC from advanced cancer patients. *Anticancer Res* 18:3951-3956, 1998
47. Naithon, J., Belledegrun A.: Gene therapy the future is here. *J. Urol* 51: 367-380, 1998.
48. 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.
49. Jain, J., Loh, C., and Rao, A.: Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 7:333-342, 1995.
50. Lichtenstein, M. J., Murlow, C. D., and Elwood, P. C.: Guidelines for reading case-control studies. *Chron Dis* 9:893-903, 1987.
51. Jhon S., Turner D., Donn R.: Two novel biallelic polymorphisms in the IL-2 gene. *Eur J of Immunogenetics* 25:419-420, 1998.