

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADOS
UNIDAD SEDE CENTRO MÉDICO

HOSPITAL DE ONCOLOGÍA
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

LA PARTICIPACIÓN DE LA PROLACTINA EN LA PROGRESIÓN Y EN LA RESPUESTA A TRATAMIENTO EN EL CÁNCER COLO-RECTAL

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M.C.MARCOS GUTIÉRREZ DE LA BARRERA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

CONTENIDO

RESUMEN.....	5
Introducción y planteamiento	5
Resultados	6
Conclusiones	7
INTRODUCCIÓN	9
El cáncer colo-rectal en el Mundo y en México	9
La progresión neoplásica	9
Los marcadores biológicos en Oncología	9
La prolactina.....	10
La PRL y las neoplasias	12
La PRL como factor pronóstico en cáncer colo-rectal.....	12
La angiogénesis.....	13
Las PRLs, las Vasoinhibinas y la angiogénesis.....	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
HIPÓTESIS.....	16
Primera parte	16
Segunda parte	16
OBJETIVOS	16
Primera parte	16
Segunda parte.....	16
PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
Formación de la cohorte	17
Determinación de Prolactina.....	18
Formación de grupos para análisis de supervivencia	18
Análisis de las propiedades angiogénicas de la prolactina circulante	19
Selección de los sueros.....	19
Ensayo de proliferación de células endoteliales.....	19
Modelos matemáticos para analizar las curvas proliferación endotelial	20

RESULTADOS	22
Asociaciones entre los niveles circulantes de PRL y la supervivencia de los pacientes.....	22
Diferencias entre el grupo con cáncer rectal y con cáncer de colon	22
Análisis de las propiedades angiogénicas de la prolactina circulante en pacientes con cáncer colo-rectal.....	34
Efecto angiogénico de la prolactina exógena en presencia del suero de pacientes con cáncer colo-rectal.....	36
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	42
REFERENCIAS	43

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS Y TRATAMIENTOS DE LOS PACIENTES CON CÁNCER COLO-RECTAL.....	23
TABLA 2. CONCENTRACIÓN DE PROLACTINA EN PACIENTES CON CÁNCER COLO-RECTAL.....	24
TABLA 3. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PRL.....	25
TABLA 4. CONCENTRACIÓN DEL PROLACTINA DE ACUERDO CON LA ETAPA TNM	26

RESUMEN

Introducción y planteamiento

El cáncer colo-rectal es un problema de salud pública en México. La progresión de la enfermedad antes, durante y después del tratamiento, y la respuesta a éste, son fenómenos con alta variabilidad clínica, con fuertes determinantes biológicas cuyo conocimiento tiene un potencial de aplicación clínica importante.

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica originalmente descrita por su función estimulante de la producción de leche en los mamíferos. Sin embargo, esta proteína junto con sus derivados, constituye una familia de hormonas y citocinas a la que ya se le han descrito muy variadas funciones en múltiples campos fisiológicos y fisio-patológicos. En el campo de las neoplasias, hay información epidemiológica, clínica, y preclínica que indica que la PRL y sus derivados poseen funciones importantes en la biología tumoral; estas funciones tienen implicaciones clínicas múltiples que actualmente se encuentran en estudio o aún por explorarse.

Nuestro trabajo se ubica en el área de las acciones tumorales de la PRL, y se basa en determinaciones realizadas en una cohorte de pacientes con cáncer colo-rectal atendidos en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, y de un grupo control de sujetos sanos donadores de sangre del Banco Central de Sangre del mismo Centro Médico. Nuestro planteamiento fue el de explorar posibles asociaciones pronósticas de la PRL circulante en pacientes con cáncer colo-rectal e investigar si estas asociaciones pudiesen reflejar acciones de la PRL sobre el proceso de la angiogénesis inducido por la neoplasia en este grupo de enfermos.

Resultados

En la descripción de nuestra cohorte, encontramos que la concentración de PRL sérica en los pacientes con cáncer colo-rectal esta dentro del rango de normalidad (< 20 ng/ml), que no coincidían con algunos reportes previos de una alta incidencia de hiperprolactinemia (≥ 20 ng/mL) en sujetos con cáncer de colon. La ausencia de hiperprolactinemia en nuestro grupo de pacientes se mantuvo aún utilizando el mismo método para evaluar PRL empleado en los reportes previos.

Durante el seguimiento de la cohorte, encontramos asociaciones pronósticas de los niveles circulantes de PRL. Los pacientes con cáncer de colon y PRL sérica en la percentil 75 o por encima de ella tuvieron una desventaja en supervivencia global a tres años (22% vs 73% $p=0.01$) en comparación con los pacientes con PRL sérica por debajo de ese punto de corte. Sin embargo para el grupo de pacientes con cáncer de recto, tratados es su mayoría con radioterapia, observamos exactamente lo opuesto: el grupo con PRL sérica en la percentil 75 o por encima de ella tuvieron una ventaja en supervivencia global en relación con el resto del grupo (88% vs. 44%, $p=0.05$); de hecho esta diferencia en supervivencia se hizo más significativa (100% vs. 34%, $p=0.005$) cuando el criterio de comparación fue no la localización (colon vs. recto) sino el tratamiento (con y sin radioterapia). En el mismo sentido encontramos que para los pacientes con cáncer de colon existe una correlación entre el valor sérico de PRL y la etapa anatómico-clínica de avance de la neoplasia, mientras esa correlación no fue evidente para el subgrupo de los pacientes con cáncer de recto.

Por otro lado, en una etapa experimental exploramos la posible participación de la PRL en el proceso de la angiogénesis en el contexto de la información clínica ya descrita. Llevamos a cabo ensayos de angiogénesis donde evaluamos el efecto de concentraciones

crecientes del suero de pacientes de nuestra cohorte y del grupo control sobre la proliferación de células endoteliales en cultivo y manipulamos la concentración de PRL en el suero a través de dos métodos: inmunosequestro mediante la adición de anticuerpos anti-PRL en un grupo de experimentos, o bien adición de PRL exógena en otro grupo de experimentos. En el primer caso, con el bloqueo de la PRL, encontramos una reducción relativa de la actividad de proliferación endotelial limitado al grupo de los pacientes con cáncer y con PRL en la percentila 75 (y no en los sujetos sanos o en los enfermos con PRL por debajo de la percentil 75). En el segundo caso, encontramos que mayores concentraciones de PRL exógena inducen mayor proliferación de células endoteliales solo en presencia de suero de pacientes con cáncer, pero no en presencia de suero de sujetos control.

Conclusiones

Las asociaciones pronósticas y de progresión observadas sugieren que la PRL influye sobre la progresión neoplásica y la respuesta tumoral a la radioterapia. Dicha influencia ocurre de manera opuesta en función de la localización del tumor y/o del tratamiento con radioterapia. Si bien se desconocen las razones de dicha influencia, es posible que éstas involucren efectos de la PRL y de las vasoinhibinas sobre la angiogénesis. Se ha reportado que la PRL estimula la angiogénesis en diversos modelos experimentales mientras que péptidos derivados de la proteólisis de la PRL, denominados vasoinhibinas, tienen efectos antiangiogénicos. En nuestro trabajo mostramos que el suero de pacientes con cáncer de colon contiene una PRL inmunorreactiva con propiedades angiogénicas que pudiera explicar la asociación de los niveles circulantes más altos de PRL con una menor supervivencia en este grupo de pacientes. Además, el hecho de que una preparación pura de

la hormona estimula la proliferación de células endoteliales en cultivo solamente en presencia de suero de pacientes con cáncer sugiere que en la circulación de estos pacientes se encuentran factores capaces de propiciar las acciones proangiogénicas de la PRL. Queda por determinar si en pacientes con cáncer de recto sometidos a radioterapia tiene lugar un mayor procesamiento de la PRL hacia vasoinhibinas y por ende la generación de factores antiangiogénicos capaces de contrarrestar la progresión del padecimiento. En conclusión, proponemos que acciones sobre la angiogénesis pudieran contribuir a aclarar las relaciones de la PRL con la progresión del cáncer colo-rectal observadas en este estudio y en estudios previos. Estos hallazgos generan nuevas preguntas que dan pie a la continuación de esta línea de investigación.

INTRODUCCIÓN

El cáncer colo-rectal en el Mundo y en México.

El cáncer colo-rectal se reportó en México durante el año 2002 con una incidencia de 5604 casos a una tasa ajustada para la edad de 7.45/100 000 y con 3179 muertes a una tasa ajustada para la edad de 4.3/100 000¹. Hay evidencia de que la frecuencia y la mortalidad por este padecimiento han ido aumentando rápidamente², siguiendo en este sentido cada vez más un patrón epidemiológico semejante al de los países industrializados.

La progresión neoplásica

La progresión de la enfermedad antes, durante y después del tratamiento, y la respuesta a éste, son fenómenos con alta variabilidad clínica, con fuertes determinantes biológicas^{3,4} cuyo conocimiento tiene un potencial de aplicación clínica importante⁵⁻⁸. Los sistemas de salud en general y el clínico en lo particular se enfrentan al reto de, por una parte, prevenir la aparición de neoplasias y detectar tempranamente las generadas, y por otra de mejorar la selección de pacientes que se beneficiarán de un determinado tratamiento y la efectividad de estos.

Los marcadores biológicos en oncología

La agrupación pronóstica y con fines de asignación de tratamientos en esta disciplina se ha efectuado fundamentalmente con base en la determinación de la progresión anatómica de la neoplasia; sin embargo los grupos o categorías formados bajo este criterio son sumamente heterogéneos para esos fines, dada, por una parte, la gran variabilidad biológica de la neoplasia y, por otra parte, el alto grado de error que existe en el proceso mismo de la asignación de cada paciente a una etapa. Ha sido por tanto motivo de amplísimo estudio la posible agrupación de los pacientes en categorías determinadas por la caracterización

biológica de su enfermedad y parecería que será la complementación de ambos abordajes o aproximaciones (la etapificación anatómica y la caracterización biológica) la que pudiera tener el mejor desempeño en las tareas precisamente de elaboración pronóstica y de asignación terapéutica.

Por otra parte, la caracterización biológica de los padecimientos oncológicos ha permitido el desarrollo de bio-marcadores capaces de mejorar el diagnóstico y la elaboración del pronóstico mediante pruebas más sensibles, más específicas o más rápidas que los medios tradicionales y la formación de grupos de pronóstico más homogéneos; asimismo el mayor conocimiento de la biología tumoral ha permitido la identificación de blancos terapéuticos que de hecho han derivado en el diseño de nuevos tratamientos, cada vez más efectivos.

La identificación de bio-marcadores es por tanto de enorme importancia para el desarrollo de la oncología, ya que permiten mejorar la fase del diagnóstico, establecer con más precisión el pronóstico e individualizar y permitir el desarrollo de nuevos tratamientos

La Prolactina

La Prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica originalmente descrita por su función estimulante del desarrollo de la glándula mamaria y de la producción de leche en los mamíferos. La PRL es codificada por un único gen que se encuentra en todos los vertebrados y contiene seis exones⁹. La forma madura de la PRL, una vez removido el péptido señal, está formada por 199 residuos. Mediante modificaciones postraduccionales del tipo de la fosforilación, la glicosilación y la proteólisis¹⁰ se producen varias isoformas de la hormona. Así, la PRL y sus derivados conforman un grupo de proteínas que difieren estructuralmente pero también funcionalmente^{10,11}.

Para su transcripción el gen de la PRL está regulado por dos promotores: el proximal, conocido como “hipofisiario”¹² y otro, conocido como “extrahipofisiario” originalmente descrito en la expresión de PRL en tejido linfoide y en células de la decidua¹³. La secuencia primaria de la PRL es similar a la de otras dos hormonas polipeptídicas: la hormona de crecimiento (HC) y el lactógeno placentario (LP). Además, los receptores de estas tres hormonas comparten una estructura y mecanismos de señalización similares lo que en conjunto las ubica como miembros de la familia PRL/HC/LP¹⁴. A su vez los receptores de esta familia comparten características estructurales y funcionales con los receptores de las citocinas hematopoyéticas clase I por lo que se les considera miembros de la superfamilia de dichas citocinas¹⁵.

El receptor de prolactina (rPRL) es una proteína transmembranal que en cada especie mantiene el dominio extracelular constante pero varía en la longitud de la región citoplásmica; para el receptor humano esta variación da lugar a tres isoformas predominantes: la corta, la larga, y la intermedia. El rPRL se expresa en prácticamente todos los tejidos aunque el nivel de expresión varía enormemente; el gen es controlado por varios promotores, característica que también explica parte de la especificidad de la acción hormonal¹⁶.

Las funciones de la PRL por las que la molécula fue originalmente aislada y por las que adquirió su nombre son la del desarrollo y producción de leche por la glándula mamaria. Poco tiempo después, se identificó que la PRL participa también en la generación y actividad del cuerpo lúteo¹⁷. Precisamente son estas funciones las que, a la luz de los resultados con los modelos “knock out”, no pueden ser sustituidas por otras hormonas. Sin embargo el papel biológico de la PRL solo se restringe a estas funciones. A la fecha se le han descrito cerca de 300 acciones en muy diversas áreas fisiológicas, a saber, la regulación

electrolítica y osmótica, el crecimiento y el desarrollo, la reproducción, el comportamiento, la inmuno-regulación, y la angiogénesis^{18,19} En la mayoría de estos procesos funcionales, la participación de la PRL es fundamentalmente moduladora^{16,17}.

La PRL y las neoplasias

La PRL ha sido descrita asociada a la progresión de neoplasias malignas, como la prostática²⁰, la mamaria²¹ y la colo-rectal²² Específicamente en el cáncer colo-rectal se han descrito altos niveles de PRL²² y que las células neoplásicas producen y secretan PRL^{23,24}, por lo que se ha sugerido que esta producción ectópica contribuye a la hiperprolactinemia encontrada en estos pacientes²³.

La PRL como factor pronóstico en cáncer colo-rectal

En el campo clínico hay observaciones de que en pacientes con cáncer colo-rectal, el nivel plasmático de la PRL se correlaciona con el pronóstico y es un recurso más efectivo para detectar la recurrencia de la enfermedad que los datos clínicos y que el nivel sérico de antígeno carcino-embriionario (ACE). En este sentido, Patel y su grupo en la India reportaron en 1994 que en una cohorte de 114 pacientes con cáncer de colon o recto, el nivel de corte de 20 ng/mL en el valor preoperatorio de prolactina plasmática sitúa a los pacientes en dos grupos pronósticos: aquellos con prolactina por arriba de ese nivel, tienen menor probabilidad de supervivencia a tres años que el grupo con un valor de PRL por abajo del nivel mencionado²². Sin embargo, el valor predictivo de la PRL en el cáncer colo-rectal es aun controversial, ya que estudios subsecuentes no han encontrado una incidencia de hiperprolactinemia como la reportada originalmente²⁵⁻²⁷.

La angiogénesis

El proceso de formación de nuevos vasos capilares sanguíneos a partir de vasos preexistentes se conoce con el nombre de angiogénesis. Este proceso determina el crecimiento y diferenciación de los tejidos durante el desarrollo embrionario y fetal. Asimismo, aunque en la vida adulta la red capilar se renueva muy lentamente, la angiogénesis está presente en los procesos de reparación tisular, cicatrización de heridas y reacciones inflamatorias y se asocia a eventos en el aparato reproductor femenino; por ejemplo, participa en el desarrollo y ovulación de los folículos y determina la función del cuerpo lúteo y es esencial para los procesos de implantación, placentación, embarazo y lactancia²⁸.

Sin embargo, si bien la angiogénesis es primordial en diversos procesos fisiológicos, el enorme interés por la comprensión de los mecanismos que subyacen a la formación de nuevos vasos sanguíneos ha sido consecuencia del reconocimiento de diversas patologías que dependen de la sobreproducción de nuevos vasos. Por ejemplo, la angiogénesis determina el desarrollo de tumores sólidos²⁹⁻³¹, ya que los nuevos vasos sanguíneos permiten al tumor alcanzar una tasa de crecimiento máxima a través del suministro de oxígeno y nutrientes y de la extracción de sustancias de desecho; además de que los nuevos capilares proveen de una ruta para la migración de las células tumorales hacia la formación de nuevos tumores secundarios o metástasis. Otros padecimientos angiogénico-dependientes son la artritis reumatoide, donde los nuevos vasos invaden y destruyen el cartílago de la articulación y las retinopatías vaso-proliferativas donde los neovasos producen ceguera a través de desprender la retina²⁸.

Las PRLs, las vasoinhibinas y la angiogénesis

Recientemente, el espectro de funciones reguladas por PRLs se ha ampliado para incluir precisamente a la angiogénesis³²: fragmentos moleculares de PRLs se unen a receptores específicos en células endoteliales e inhiben la angiogénesis a través de efectos directos sobre el endotelio vascular que se manifiesta tanto *in vitro* como *in vivo*^{33,34}. Además, fragmentos del LP y de la GH también poseen efectos antiangiogénicos³⁵; así, se han designado como vasoinhibinas³⁶ al grupo de péptidos derivados de la PRL, el LP y la GH, que inhiben la proliferación, la migración, la asociación y la supervivencia del endotelio vascular. Además, las vasoinhibinas interfieren con la vasodilatación³⁷ y la vasopermeabilidad³⁸ asociados a la angiogénesis y a la homeostasis vascular..

Por otra parte, evidencias experimentales apoyan el que las moléculas íntegras de PRL, LP y HC estimulan la angiogénesis³⁵. En particular, estudios *in vivo* han mostrado que la PRL promueve la angiogénesis del cuerpo lúteo³⁹, el testículo⁴⁰ y el miocardio⁴¹. Además, se ha mostrado que el gen de la PRL se expresa en células endoteliales y que las PRLs son secretadas por dichas células, en donde ejercen efectos autócrinos estimulatorios sobre la proliferación endotelial^{42,43}. Así, el sistema de la PRL y las vasoinhibinas van emergiendo como elementos importantes en la regulación del proceso de la angiogénesis.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con los antecedentes planteados queda claro que la PRL ha sido postulada como una molécula que por una parte reporta información pronóstica en pacientes con cáncer colo-rectal y por otra que juega un papel importante en procesos biológicos determinantes en la progresión tumoral en general, como es la regulación de la

angiogénesis. Así, nos planteamos explorar por un lado si la observación sobre su valor pronóstico en cáncer colo-rectal es reproducible en el ámbito del tratamiento multidisciplinario del cáncer (cirugía, radioterapia, quimioterapia), ya que la información disponible no incluía a grupos tratados con quimioterapia y radioterapia preoperatorias, y por otro lado si esa asociación pronóstica esta mediada en parte por acciones proangiogénicas de la PRL.

HIPÓTESIS

Primera Parte

La PRL aporta información pronóstica en pacientes con cáncer colo-rectal en grupos de pacientes para los que se incluye la quimioterapia y la radioterapia preoperatorios

Segunda Parte

La PRL circulante es promotora de la angiogénesis en pacientes con cáncer colo-rectal

OBJETIVOS

Primera Parte

Determinar la asociación pronóstica del nivel de PRL circulante en un grupo de pacientes con cáncer colo-rectal tratados en el ámbito de un abordaje multidisciplinario (cirugía, radioterapia y quimioterapia) diferente a los esquemas usados para los grupos descritos en la literatura científica.

Segunda Parte

Analizar la posible acción angiogénica de la PRL circulante en pacientes con cáncer colo-rectal

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

Formación de la cohorte

Entre diciembre de 1999 y diciembre del 2000 se formó una cohorte con 82 pacientes consecutivos con adenocarcinoma colo-rectal (ACCR) sin tratamiento previo y que aceptaron participar en el estudio. Todos los pacientes tenían confirmación histopatológica de la neoplasia y firmaron una carta de consentimiento para participar en este estudio, el cual se llevó acabo cumpliendo los principios de la Declaración de Helsinki, y siguiendo un protocolo aprobado por el Comité de Investigación en Salud del Hospital de Oncología. Las características y tratamientos de los pacientes se detallan en la Tabla 1. De los 82 pacientes, 28 tenían tumores localizados a mas de 12 cm del margen anal (cáncer de colon), mientras que los otros 54 pacientes tenían tumores entre la línea dentada y los 12 cm proximales al margen anal (cáncer rectal). Cuarenta y cuatro pacientes recibieron radioterapia preoperatoria (RTPRO); treinta y ocho no la recibieron. En 52 pacientes (63.4%) se completó una operación con intención curativa: 27 en el grupo de RTPRO (61.4%) y 25 (65.8) en el grupo sin RTPRO. Recibieron quimioterapia (QT) preoperatoria 27 pacientes: 25 pacientes (56.8%) en el grupo con RTPRO y 2 (5.3%) del grupo sin RTPRO. Recibieron QT posoperatoria 13 pacientes (15.9%): 4 pacientes (9.1%) del grupo con RTPRO y 9 pacientes (23.7%) del grupo sin RTPRO. De entre los pacientes con cáncer de colon, solo uno de ellos (3.6%) recibió radioterapia preoperatoria (RTPRE), mientras que la mayoría de los pacientes con cáncer rectal (79.6%) recibieron RTPRE (Tabla 1). La RTPRE fue administrada a la pelvis usando una técnica de tres campos y una dosis de 45 Gy con cinco fracciones por semana, en cinco semanas consecutivas. De los 28 pacientes con cáncer de colon solo dos recibieron quimioterapia preoperatoria (QTPRE), mientras que 25 de los 54 pacientes con cáncer de recto la recibieron, concomitantemente con la radioterapia. La

quimioterapia se administró una hora antes de la radioterapia (RT) en los días 1 al 5 y 28 al 32 de la RTPRE. Se efectuó cirugía curativa (resección anterior baja, hemicolectomía, colectomía total o resección abdomino-perineal) como el primer tratamiento en 17 pacientes con cáncer de colon, ó 6 a 8 semanas después de completar RTPRE en 35 pacientes con cáncer rectal. Una proporción pequeña de pacientes de total del grupo recibieron quimioterapia y/o radioterapia posoperatorios (Tabla 1). La evaluación clínica de seguimiento se efectuó cada dos meses, tres meses y cuatro meses durante el primer año, segundo y tercer año, respectivamente e incluyó determinación del antígeno carcinoembrionario (ACE), imagenología hepática y pulmonar, así como colonoscopia.

Determinación de PRL

La determinación de PRL preoperatoria de suero obtenido siempre por la mañana y en ayunas se llevó a cabo mediante un inmunoensayo de quimio-luminiscencia basado en un sistema de fijación de la sustancia problema a microesferas cubiertas con el antecuerpo específico (Immulite⁴⁴, DPC, Los Angeles, CA).

Formación de grupos para análisis de supervivencia

Se formaron dos grupos con base en el nivel de PRL sérica preoperatoria: el de PRL “alta” formado por el cuartil con valores más altos y el de PRL “baja” formado por los otros tres cuartiles. El análisis de supervivencia fue efectuado con curvas elaboradas con el método Kaplan-Meier y comparadas con la prueba de Log-Rank.

Análisis de las propiedades angiogénicas de la PRL circulante

Selección de los sueros

Con el objeto de explorar el efecto de la PRL circulante sobre la proliferación endotelial en los pacientes con cáncer, se seleccionaron los sueros en función de la concentración de PRL circulante y su asociación con el grado de supervivencia. Así, se seleccionaron 22 pacientes de la cohorte de los 82 pacientes donde reportamos asociaciones pronósticas de la PRL⁴⁵, y a 22 controles sanos pareados por sexo y edad. La selección fue con base en los valores séricos de PRL pre tratamiento, de tal manera que de entre toda la cohorte seleccionamos a los 11 pacientes con las concentraciones más altas de PRL sérica (grupo C) y sus correspondientes 11 controles sanos (grupo A), así como a los 11 pacientes con las concentraciones más bajas (grupo D) y sus correspondientes 11 controles sanos (grupo B). Los bioensayos con los sueros de los pacientes y controles seleccionados se repitieron en tres diferentes condiciones experimentales: en ausencia de anticuerpos, en presencia de anticuerpos control y en presencia de anticuerpos anti-PRL, y para cada una de estas condiciones, se evaluó la proliferación endotelial en respuesta a seis diferentes diluciones del suero ensayado.

En otros experimentos, las BUVEC se incubaron con concentraciones crecientes (1, 5, 10 y 50 ng/ml) de PRL humana (National Hormone and Pituitary Program, Torrance, CA) en presencia del suero (5%) de los tres pacientes y de los tres controles sanos con las concentraciones más bajas de PRL.

Ensayo de proliferación de células endoteliales

Células endoteliales de cordón umbilical de Bovino (BUVEC) fueron sembradas a una densidad de 5000 células en placas de cultivo de 48 pozos en medio F12K con 10% de

suero bovino fetal (FBS). Veinticuatro horas después se reemplazó este medio con medio libre de suero (200 µl/pozo) y se adicionaron los sueros problema de los pacientes y de los controles en seis diluciones diferentes y para cada condición, por triplicado. Todos los anticuerpos se emplearon a una concentración de 6 µg/ml y fueron aislados de suero normal de conejo (anticuerpos control) o de un antisuero anti-PRL humana (anticuerpos anti-PRL) y caracterizados de acuerdo al método publicado previamente⁴⁶

En todos los casos, las incubaciones se efectuaron por 48 horas y se midió la proliferación endotelial a través de la reducción de 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5 bromuro de difeniltetrazolio o MTT a través del método previamente descrito⁴⁷ Brevemente, se adicionaron 10 µl de MTT (5 mg/ml) y las células se incubaron por 4 horas al cabo de las cuales el producto precipitado de la reducción del MTT (formazan) se solubilizó con 100 µl de SDS al 10%, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se cuantificó a través de medir su absorbancia a 590nm. Este método colorimétrico ha sido validado como índice de la proliferación celular⁴⁷

Modelos matemáticos para analizar las curvas de proliferación endotelial

De acuerdo a los procedimientos descritos se obtuvieron cuatro curvas de proliferación: (A) de personas sanas con PRL “alta”, (B) de personas sanas con PRL “baja”, (C) de pacientes con cáncer colo-rectal con PRL “alta” y (D) de pacientes con cáncer colo-rectal con PRL “baja”, cada una de ellas bajo tres condiciones diferentes: ausencia de anticuerpos, presencia de anticuerpos control o de anticuerpos anti-PRL.

Para cada una de las tres situaciones experimentales, se ajustó un modelo de regresión cuadrático para describir el comportamiento de la proliferación endotelial en función de las seis diluciones de suero consideradas para cada uno de los pacientes y para cada uno de los

controles. La proliferación endotelial por individuo dentro del modelo se refiere al promedio de tres ensayos. La evaluación de los modelos se resume en el comportamiento de 12 curvas resultantes (4 grupos de individuos x 3 situaciones experimentales). A partir de estas doce curvas y los parámetros que las describen se llevan a cabo las comparaciones de interés entre grupos y/o situaciones experimentales.

De acuerdo con el método descrito y los resultados del ajuste de las curvas de proliferación, se obtuvo la curva promedio por grupo clínico (promedio de valores de todos los sujetos dentro del grupo), la cual, en cada caso, es una forma cuadrática definida a partir de 3 parámetros: la ordenada al origen, la pendiente y la curvatura. La comparación entre grupo de individuos (por cada situación experimental) se centra en la comparación conjunta de los 3 parámetros mencionados y se lleva a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA). Las fuentes de variación en dicho análisis son: variación entre modelos (desglosada en tres componentes: entre grupos, efecto lineal y efecto cuadrático), variación residual y variación total. La evaluación de posibles diferencias entre grupos mediante comparaciones múltiples se analizó considerando al grupo de los individuos sanos con baja prolactina (grupo B) el grupo de referencia.

RESULTADOS

Primera Parte:

Asociaciones entre los niveles circulantes de PRL y la supervivencia de los pacientes:

Diferencias entre el grupo con cáncer rectal y con cáncer de colon

El grupo de pacientes con cáncer de colon fue similar al de los pacientes con cáncer rectal en lo que respecta a edad, sexo y proporción sometida a una resección curativa, tratamiento posoperatorio y enfermedad en etapa IV de acuerdo con la clasificación Tumor-Nodo-Metástasis (TNM; Tabla 1). Sin embargo los grupos difirieron en la proporción de pacientes que recibieron RTPRE (P=0.000, prueba X²) y QTPRE (P=0.000, prueba X²) (Tabla 1). Estas diferencias eran esperables ya que la RTPRE está indicada actualmente para pacientes con cáncer rectal pero no para pacientes con cáncer de colon y la QTPRE está indicada como radio-sensibilizador. En cuanto la etapificación, la comparación solo se hizo para las etapas IV ya que para las etapas 0 a III su “migración” por el tratamiento preoperatorio con QT y RT, las hace no comparables.

Los valores en la determinación de PRL sérica estuvieron en el rango normal (3-24 ng/mL) y la concentración media (8.9 ± 4.8 (DE) ng/mL) fue similar entre los pacientes con cáncer de colon y los pacientes con cáncer de recto (Tabla 2). La distribución de los pacientes de acuerdo a su nivel de PRL en o por arriba del cuartil mas alto (PRL “alta”) o por debajo de este nivel (PRL “baja”) no varió con respecto al sexo, la edad de los pacientes, la localización del tumor, la presencia o ausencia de RTPRE, o la presencia o ausencia de QTPRE (Tabla 3). En el grupo con cáncer de colon

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS Y TRATAMIENTOS DE LOS PACIENTES CON CÁNCER COLO-RECTAL

	<i>Cohorte</i>	<i>Colon</i>		<i>Recto</i>		<i>P</i>
Número, <i>n</i>	82	28		54		
Sexo, <i>n (%)</i>						
Masculino	47 (57.3)	14 (50)		33 (61.1)		0.35*
Femenino	35 (42.7)	14 (50)		21 (38.9)		
Edad, <i>años</i>						
Media	59	55.5		61.8		0.17**
Rango	63	56		59		
Min-Max	22	22-78		26-85		
	-					
	85					
Tratamiento, <i>n (%)</i>						
RTPRE	44 (53.7)	1 (3.6)		43 (79.6)		0.000*
PREQUIM	27 (32.9)	2 (7.1)		25 (46.3)		0.000*
Cirugía intención curativa	52 (63.4)	17 (60.7)		35 (64.8)		0.44*
Quimioterapia posoperatoria	13 (15.9)	6 (21.4)		7 (13)		0.24*
Radioterapia posoperatoria	5 (6.1)	2 (7.1)		3 (5.6)		0.56*
TNM-Etapa, <i>n (%)</i>						
0	4 (4.9)	1 (3.6)		3 (5.6)		NC
I	8 (9.8)	2 (7.1)		6 (11.1)		NC
II	24 (29.3)	9 (32.1)		15 (27.8)		NC
III	14 (17.1)	5 (17.9)		9 (16.7)		NC
IV	24 (29.3)	9 (32.1)		15 (27.8)		0.22*
No conocida	8 (9.8)	2 (7.1)		6 (11.1)		NC

* X^2 comparando las proporciones entre los grupos de pacientes de colon vs. recto. ** T de Student test comparando la media de edad entre ambos grupos. (TNM) Clasificación Tumor-Nodo-Metástasis. No comparable (NC).

TABLA 2. CONCENTRACIÓN DE PRL EN PACIENTES CON CÁNCER COLO-RECTAL

	<i>Cohorte</i>	<i>Colon</i>	<i>Recto</i>	<i>P</i>
PRL (ng/ml)				
Media	8.9	9.14	8.80	0.76*
Rango	21	20	21	
Min-max	3-24	3-23	3-24	
Percentilas				
<75	5.5	4.9	5.4	0.28**
≥ 75	15.6	15.3	15.8	

* T de Student comparando media de la concentración de PRL entre grupos de colon y recto. ** U Mann-Whitney comparando la distribución de PRL en y sobre la 75^a percentila y por debajo de este nivel, entre los grupos de colon y recto.

TABLA 3. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PRL

	<i>Cohorte</i>		<i>PRL “alta”</i>		<i>PRL “baja”</i>		<i>P</i>
Número	82		20		62		
Sexo, <i>n (%)</i>							
Masculino	47	(57.3)	12	(60.0)	35	(56.5)	0.78*
Femenino	35	(42.7)	8	(40.0)	27	(43.5)	
Edad, <i>años</i>							
Media	59		57.4		60.4		0.42*
Rango	63		50		63		
Localización, <i>n (%)</i>							
Colon	28	(34.1)	19	(30.6)	9	(45)	0.28*
Recto	54	(65.9)	43	(69.4)	11	(55)	
Tratamiento, <i>n (%)</i>							
No-RTPRE	38	(46.3)	11	(55)	27	(43.5)	0.37*
RTPRE	44	(53.7)	9	(45)	35	(56.4)	
No-PREQUIM	55	(67.1)	13	(65)	42	(67.7)	0.82*
PREQUIM	27	(32.9)	7	(35)	20	(32.3)	

* X^2 comparando las proporciones de pacientes con concentraciones de PRL en o sobre el valor en la percentila 75^a (PRL “alta”) con los valores por debajo de esa percentila (PRL “baja”).

TABLA 4. CONCENTRACIÓN DE PROLACTINA DE ACUERDO
CON LA ETAPA TNM

	<i>Cohorte</i>	<i>Colon</i>			<i>Recto</i>		
		<i>PRL “alta”</i>	<i>PRL “baja”</i>	<i>P</i>	<i>PRL “alta”</i>	<i>PRL “baja”</i>	<i>P</i>
Número	82	9	19		11	43	
Etapa, <i>n</i> (%)							
0	4	0	1 (5.3)	0.01*	1 (9.1)	2 (4.7)	0.32*
I	8	0	2 (10.5)		1 (9.1)	5 (11.6)	
II	24	2 (22.2)	7 (36.8)		4 (36.4)	11 (25.5)	
III	14	0	5 (26.3)		2 (18.2)	7 (16.3)	
IV	24	6 (66.7)	3 (15.8)		3 (27.3)	12 (27.9)	
Desconocida	8	1 (11.1)	1 (5.3)		0	6 (14.0)	

* Prueba de Spearman comparando las correlaciones entre la etapa en el sistema Tumor –Nodo-Metástasis (TNM) y grupo por el valor de PRL en y sobre la percentila 75^a (PRL “alta”) y el grupo con valores debajo de ese nivel (PRL “baja”).

encontramos una correlación entre la etapa de progresión en el sistema TNM y la PRL (Tabla 4), con el grupo de PRL “alta” mostrando una mayor proporción de pacientes con etapas avanzadas, en comparación con el grupo de PRL “baja” ($P=0.01$ prueba rho de Spearman). No encontramos una correlación significativa dentro del grupo con cáncer rectal.

Para todos los pacientes, la mediana de supervivencia fue de 27 meses (rango de 1 a 60 meses). El porcentaje de sobrevida global fue 53.7% (44 de 82 pacientes). Todas las muertes ocurrieron por progresión del cáncer. De los 44 pacientes que permanecían vivos al corte del estudio, 5 tuvieron recurrencia y 39 estuvieron libres de enfermedad. Se confirmó la asociación entre la etapa clínico-patológica en el sistema TNM y la supervivencia global tanto para el grupo completo como considerando al grupo de cáncer rectal y al de cáncer de colon por separado ($P=0.0000$, prueba de Log-Rank)

En el grupo de los pacientes con cáncer de colon, los valores de PRL “alta” se asociaron con una sobrevida global significativamente más corta que aquellos con PRL “baja” (22 % vs. 73%, $P=0.01$, Prueba Log-Rank) (Fig. 1A) En contraste, en los pacientes con cáncer rectal el grupo con PRL “alta” tuvo una mayor supervivencia que los de PRL “baja” (81% vs.44%, $P=0.05$, prueba de Log Rank) (Fig. 1B). Estas observaciones sugieren que los niveles de PRL circulante se asocian con desenlaces opuestos en los grupos de cáncer de colon o de recto.

Dado que la mayoría de los pacientes con cáncer rectal recibió RTPRE y QTPRE, mientras que los pacientes con cáncer de colon no recibieron estos tratamientos, exploramos a la RTPRE y la QTPRE como criterios de formación de subgrupos para evaluar el impacto de los niveles de PRL sobre la supervivencia. En los pacientes sin RTPRE al igual que en los pacientes con cáncer de colon, la PRL “alta” se asoció con una

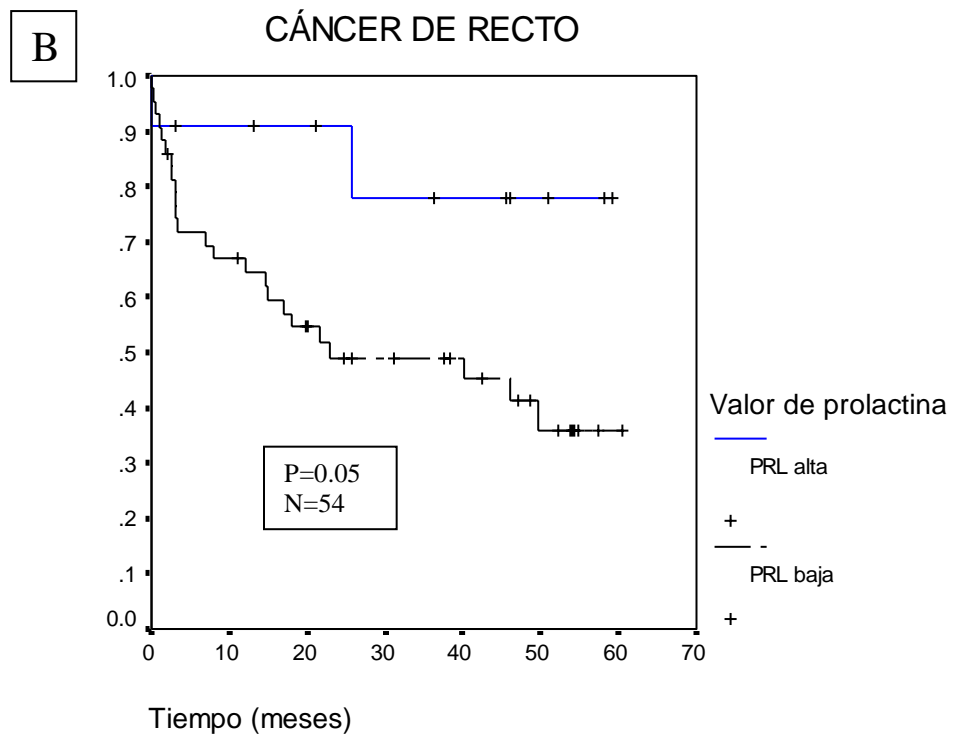
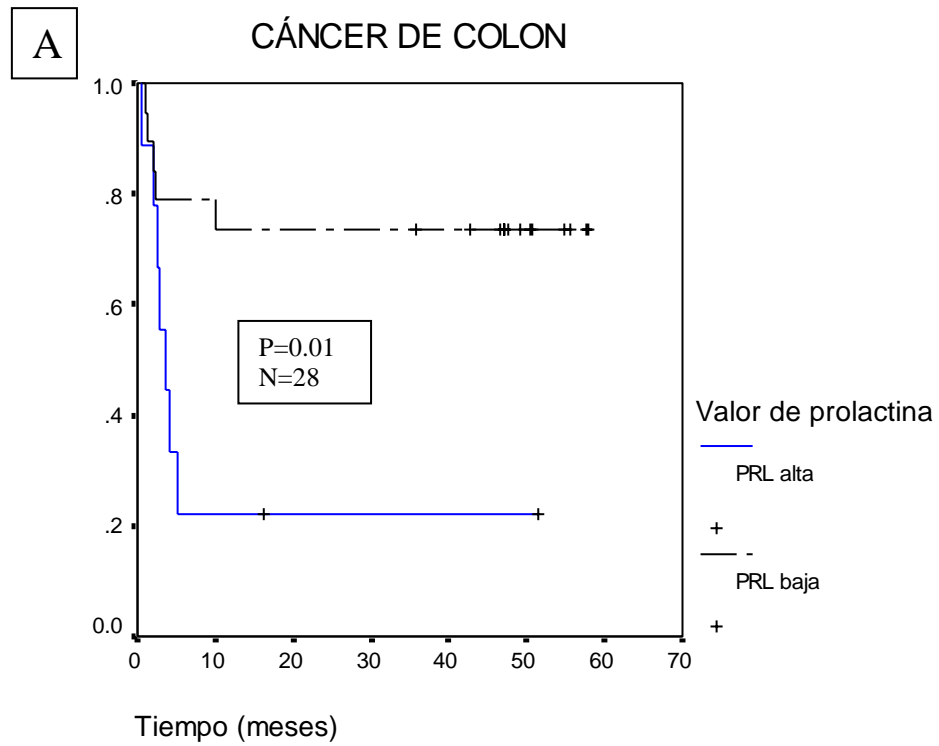


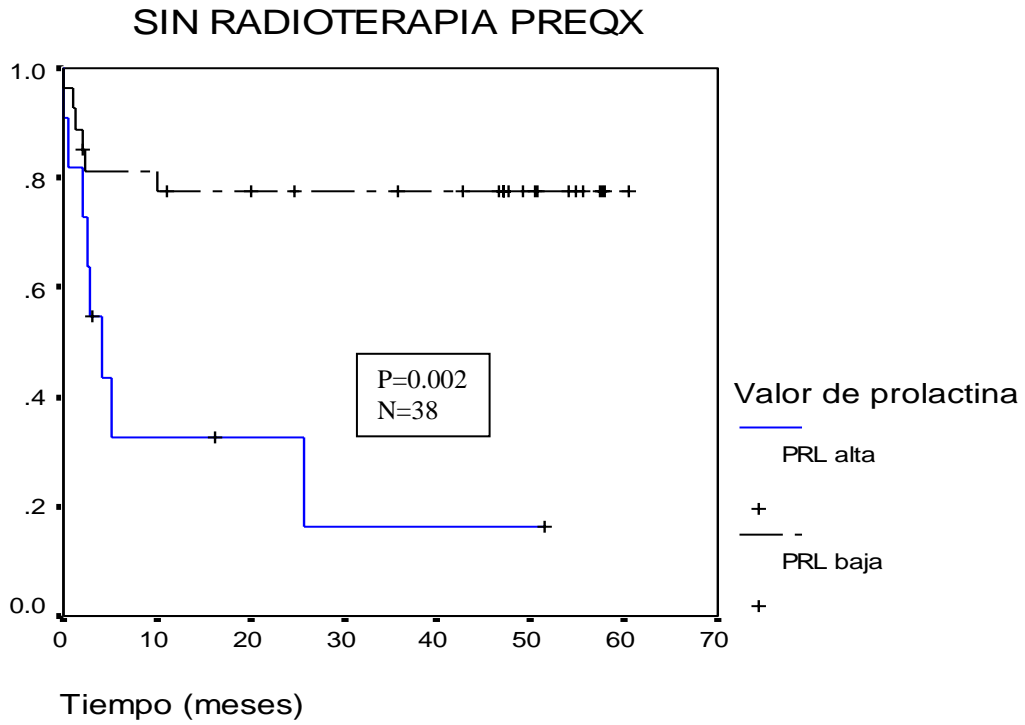
Fig 1. Valor de PRL pre-tratamiento y supervivencia global en pacientes con cáncer de colon (A) o de recto (B). Los pacientes se situaron de acuerdo con su valor de PRL en o por arriba de la percentila 75 (línea azul), o bien por debajo de ésta (línea negra).

supervivencia global significativamente más corta comparada con el subgrupo de PRL “baja” (27 % vs. 77.8%; $P=0.002$, prueba de log rank) (Fig. 2 A). En los pacientes con RTPRE, al igual que en el grupo de pacientes con cáncer rectal, el grupo con PRL “alta” tuvo una supervivencia global mayor que el grupo con PRL “baja” (88.9% vs. 34.3%; $P=0.014$, prueba de log-rank) (Fig. 2B). No encontramos diferencias significativas entre los subgrupos con PRL “alta” y “baja” utilizando la QTPRE como criterio de división ($P=0.67$ o $P=0.73$, respectivamente) (Fig. 3A y B).

También analizamos si la asociación de la PRL con la supervivencia en el grupo con RTPRE tiene relación con la localización del tumor. En los pocos pacientes con cáncer rectal que no recibieron RTPRE, la asociación de los valores de PRL con la supervivencia fue opuesta a la esperada para el grupo de cáncer rectal, a saber, los valores de PRL “alta” se asociaron con una sobrevida más corta (Fig. 4A), si bien esta tendencia no mostró significancia estadística (33% vs. 87%; $P=0.12$, prueba de log-rank). Además, al evaluar solamente el grupo de pacientes con cáncer rectal que recibieron RTPRE (Fig. 4B), la asociación de los niveles de PRL “alta” con la mayor supervivencia de los pacientes tuvo un nivel de significancia mayor ($P=0.005$ vs. $P=0.05$) que cuando se consideraron todos los pacientes con cáncer rectal (con y sin RTPRE).

Dado que la QTPRE fue administrada junto con la RTPRE en una proporción importante de pacientes con cáncer rectal, exploramos la influencia de QTPRE sobre la asociación entre PRL y la sobrevida de pacientes con RTPRE. Valores de PRL “alta” se correlacionaron con sobrevidas más altas independientemente de la presencia o ausencia de QTPRE, aunque las correlaciones no tuvieron significancia estadística (Fig. 5A y B). Dado que la mayoría de los pacientes (92.6%) con QTPRE recibieron RTPRE, el impacto de QTPRE independiente de RTPRE no pudo analizarse.

A



B

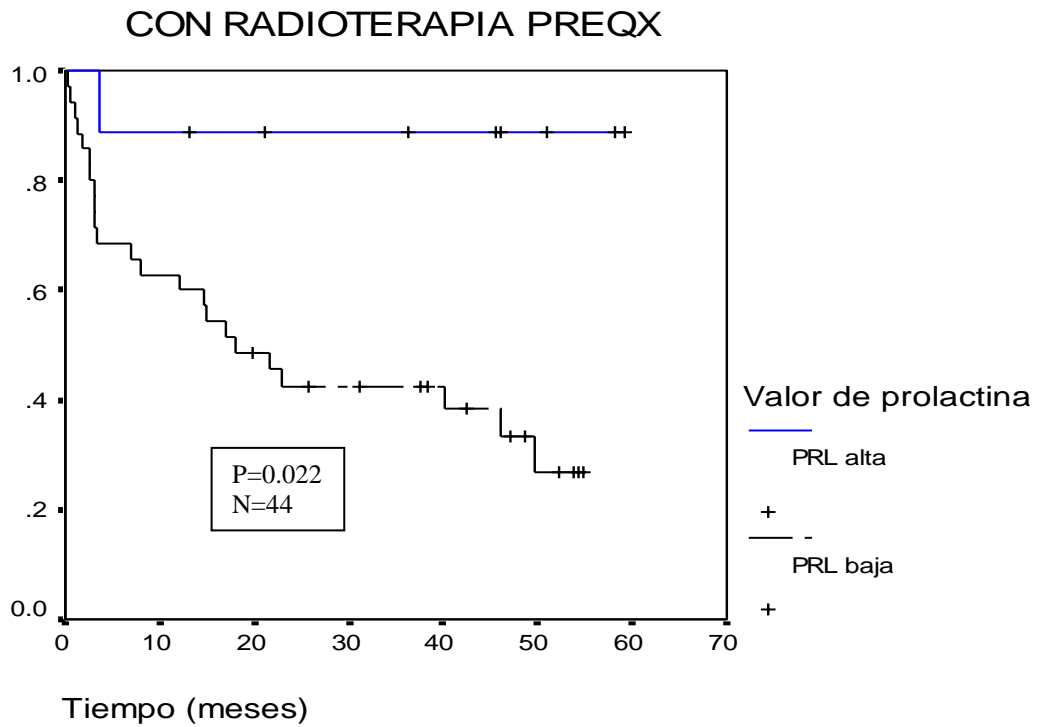
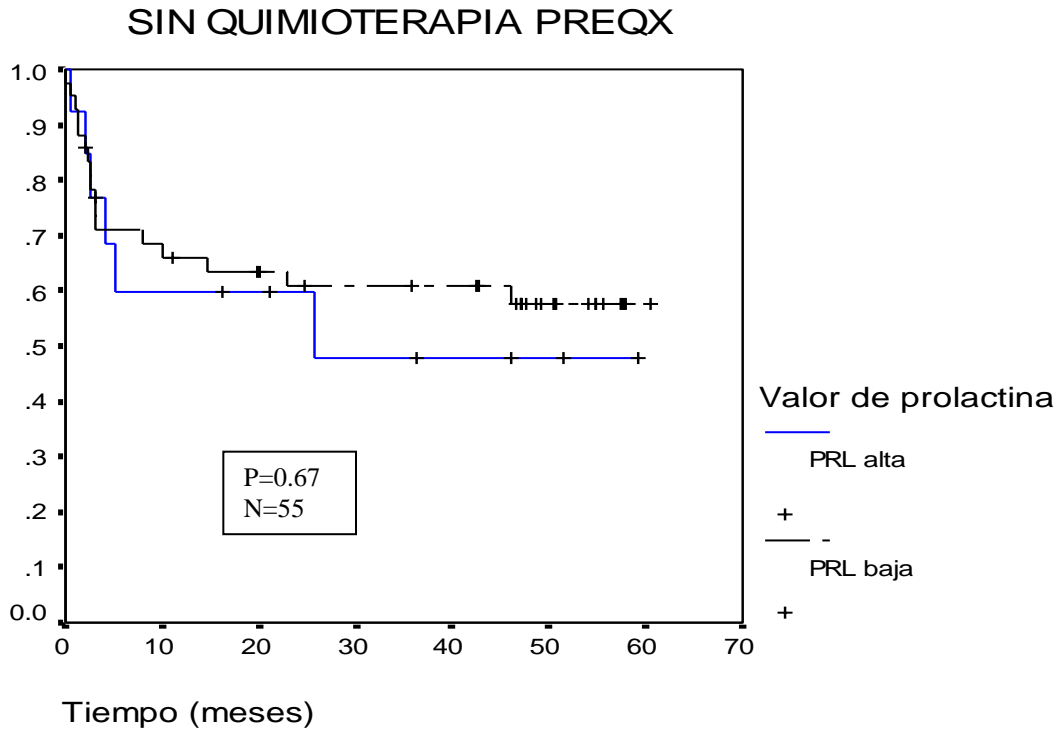


Fig. 2 Valor de PRL pre-tratamiento y supervivencia global en pacientes con cáncer colo-rectal, en ausencia (A) o presencia (B) de radioterapia pre-quirúrgica. Los pacientes se situaron de acuerdo con su valor de PRL en o por arriba de la percentila 75 (línea azul), o bien por debajo de ésta (línea negra).

A



B

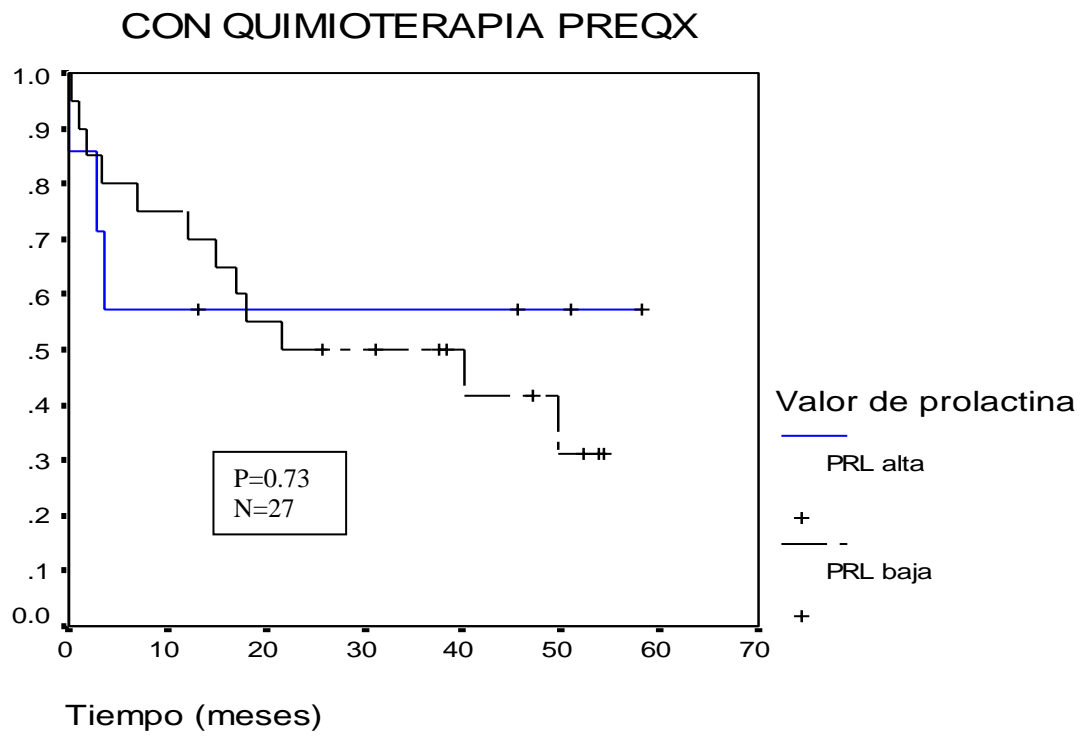


Fig. 3 Valor de PRL pre-tratamiento y supervivencia global en pacientes con cáncer colo-rectal, en ausencia (A) o presencia (B) de quimioterapia pre-quirúrgica. Los pacientes se situaron de acuerdo con su valor de PRL en o por arriba de la percentila 75 (línea azul), o bien por debajo de ésta (línea negra).

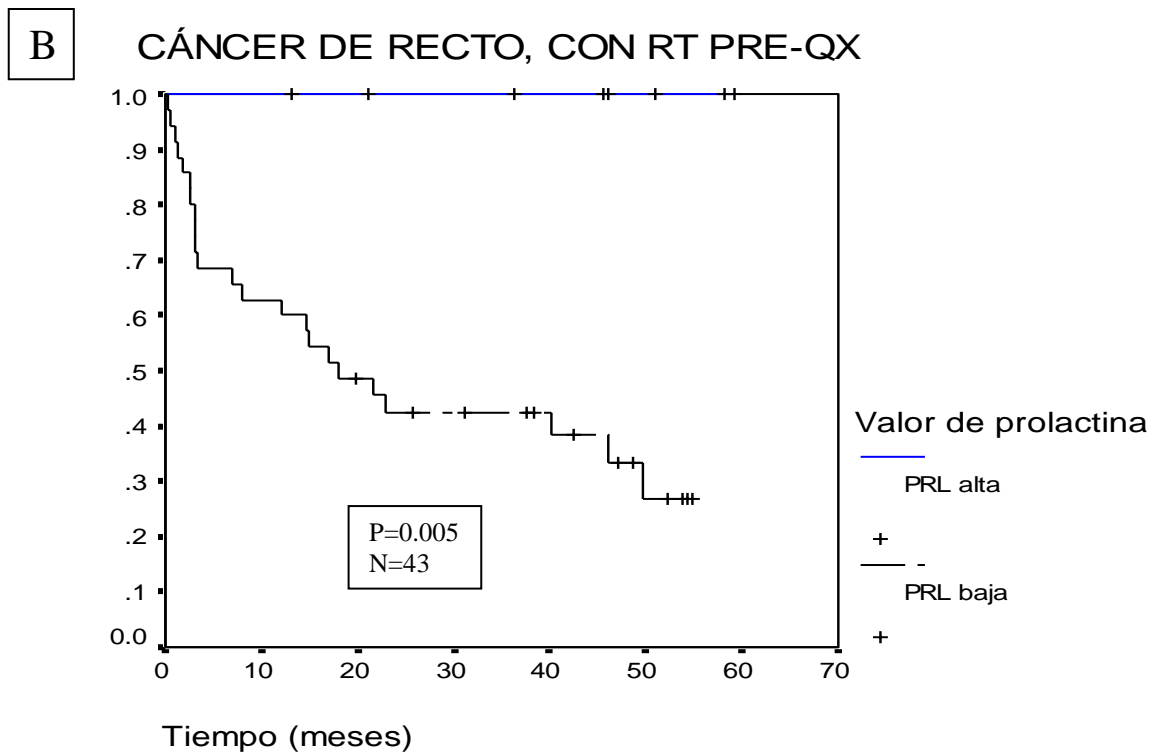
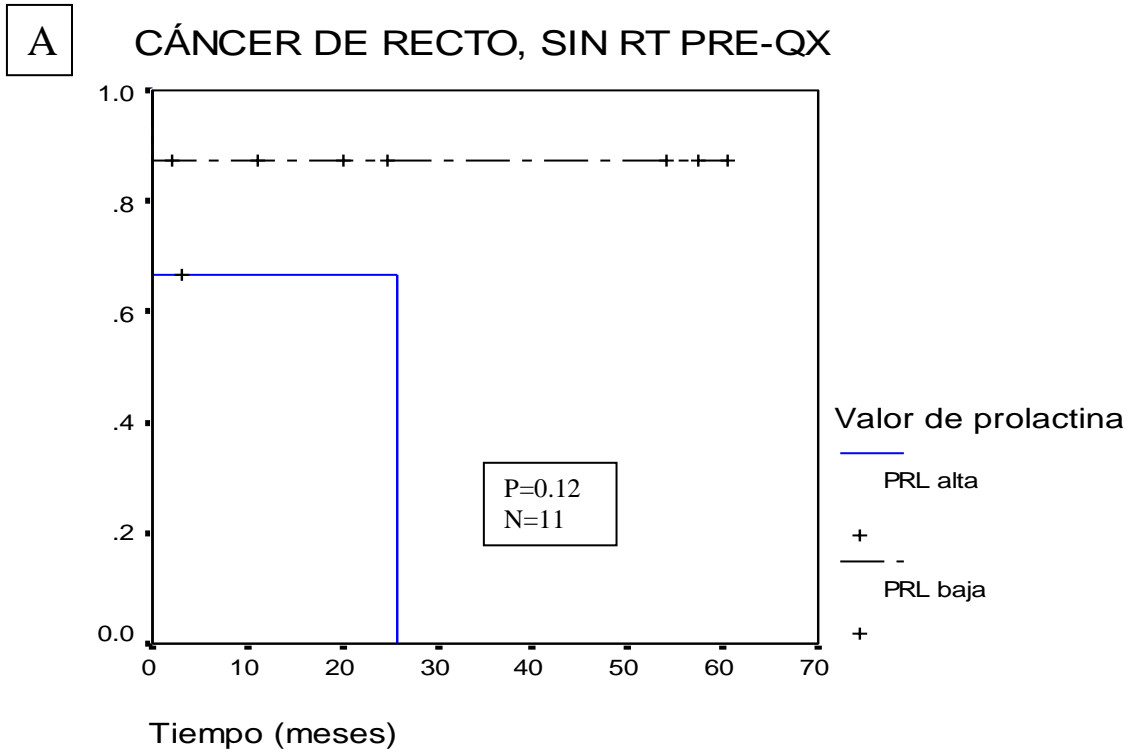


Fig. 4 Valor de PRL pre-tratamiento y supervivencia global en pacientes con cáncer rectal, en ausencia (A) o presencia (B) de radioterapia pre-quirúrgica. Los pacientes se situaron de acuerdo con su valor de PRL en o por arriba de la percentila 75 (línea azul), o bien por debajo de ésta (línea negra).

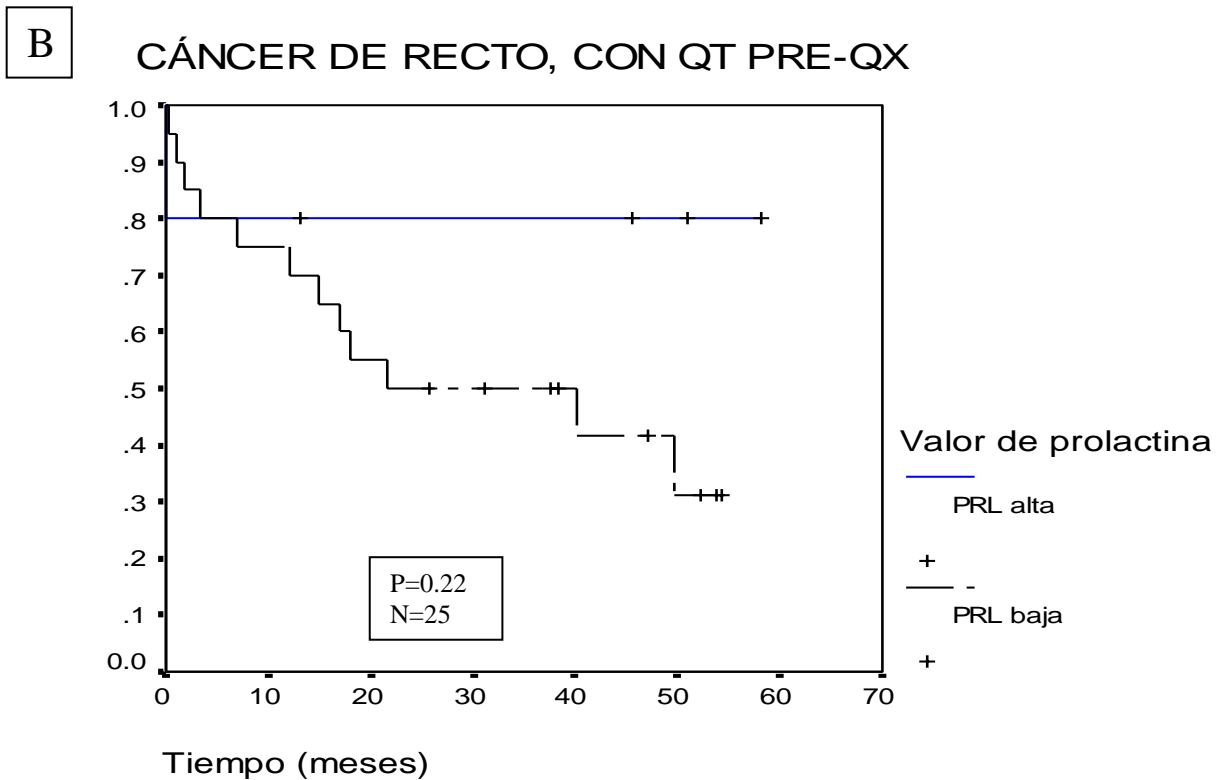
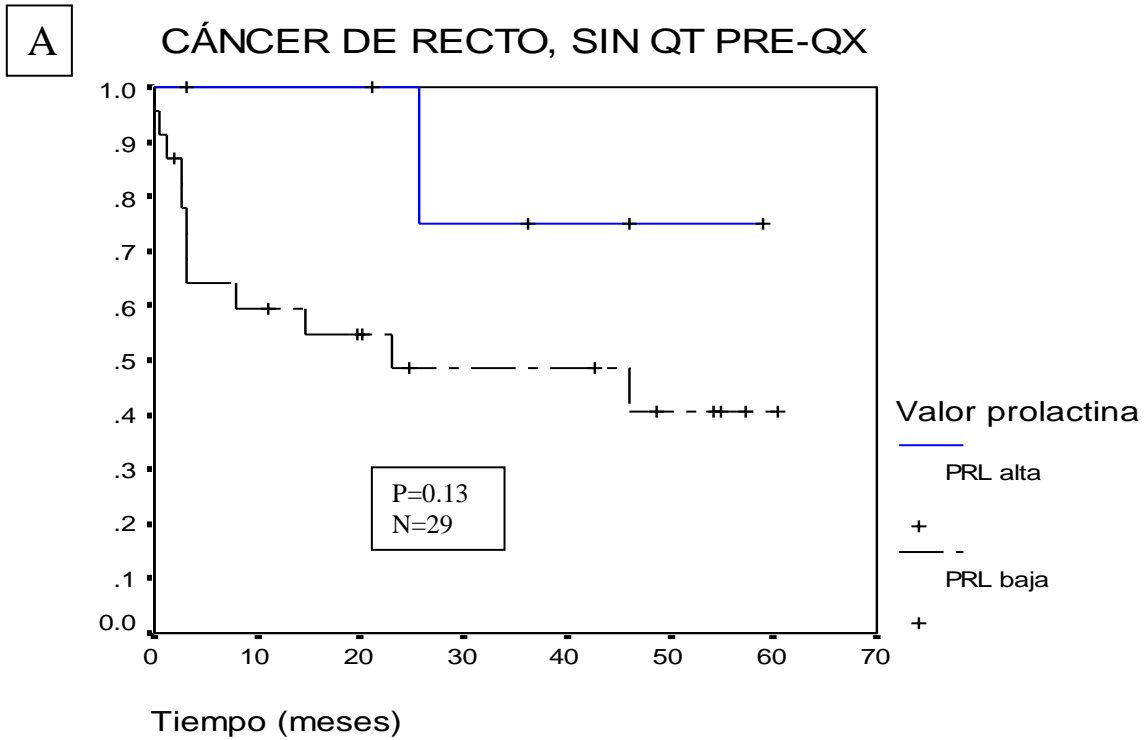


Fig. 5 Valor de PRL pre-tratamiento y supervivencia global en pacientes con cáncer rectal, en ausencia (A) o presencia (B) de quimioterapia pre-quirúrgica. Los pacientes se situaron de acuerdo con su valor de PRL en o por arriba de la percentila 75 (línea azul), o bien por debajo de ésta (línea negra).

Segunda Parte:

Análisis de las propiedades angiogénicas de la PRL circulante en pacientes con cáncer colo-rectal

Con el propósito de investigar las propiedades angiogénicas de la PRL circulante y su posible asociación con el cáncer colo-rectal evaluamos el efecto sobre la proliferación endotelial de cuatro tipos de sueros diferentes a saber: sueros de controles sanos con PRL "alta" (grupo A) o con PRL "baja" (grupo B), sueros de pacientes con cáncer colo-rectal y concentraciones de PRL "altas" (C) y "bajas" (D). Para cada grupo se evaluó el efecto de varios sueros y los resultados se integraron en curvas promedio de acuerdo a los modelos definidos en la sección de materiales y métodos. Para determinar la especificidad atribuida a PRL de los efectos observados, las diferentes diluciones de cada uno de los sueros se probaron bajo tres condiciones experimentales: en ausencia de anticuerpos, y en presencia de anticuerpos control o anticuerpos anti-PRL. En todos los casos las diferentes diluciones de los sueros definieron una curva en campana de proliferación endotelial. En ausencia de anticuerpos (Fig. 4A) o en presencia de anticuerpos control (Fig. 4B), los sueros de pacientes con cáncer colo-rectal y concentraciones de PRL "altas" (grupo C) estimularon significativamente más (ANOVA $P=0.026$) la proliferación endotelial en comparación a los otros tres grupos experimentales i.e., sueros de pacientes con PRL "baja" (grupo D) y sueros de controles sanos con PRL "alta" (grupo A) y "baja" (grupo B). Notablemente, esta diferencia no se observó (ANOVA $P=0.685$) cuando los diferentes tratamientos se realizaron en presencia de los anticuerpos antiPRL.

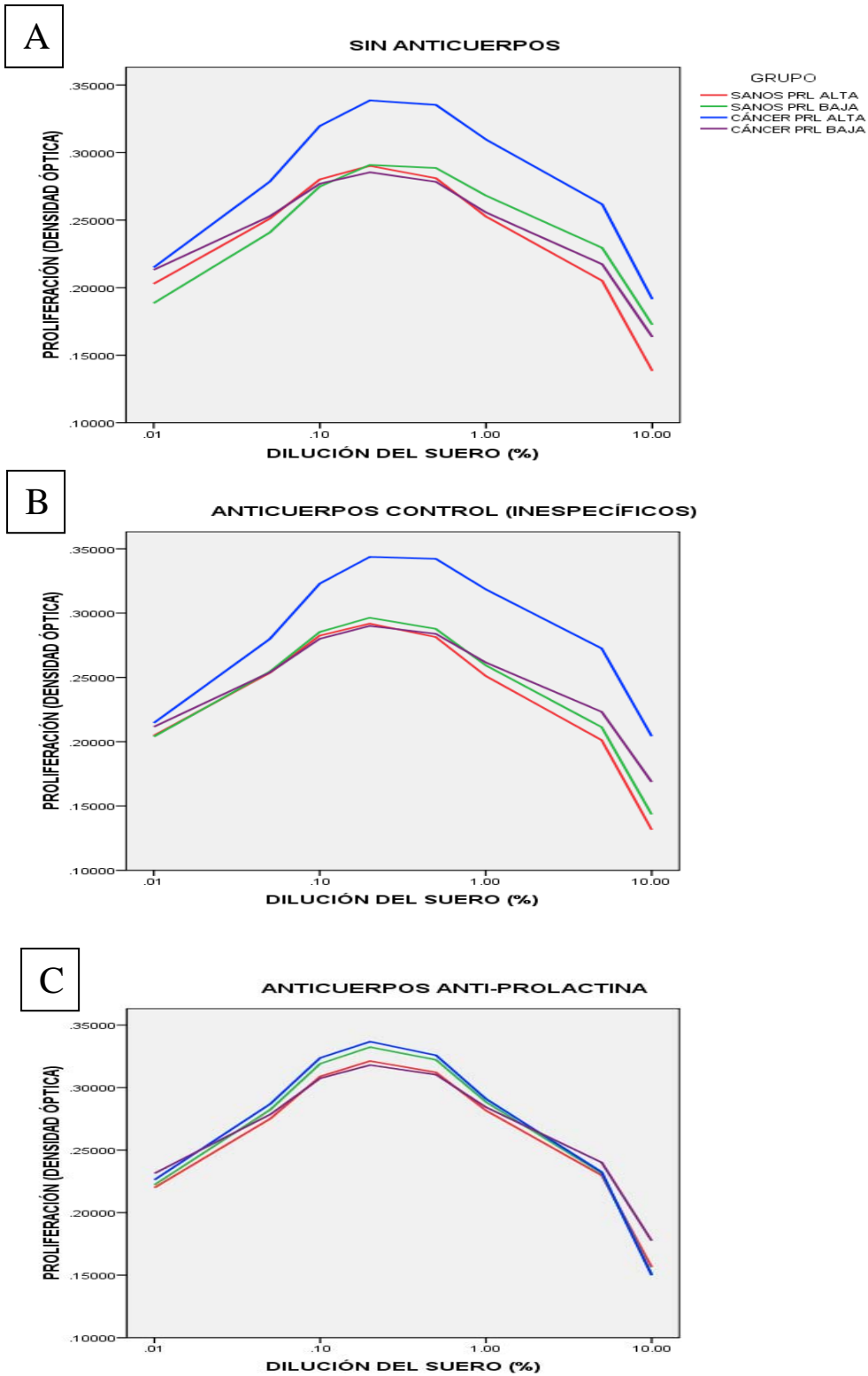


Fig. 6 Curvas de proliferación de células endoteliales en respuesta a concentraciones crecientes de suero de CCR con PRL “alta” (percentila 75 ó arriba) o “baja” (debajo de la percentila 75), (A) en ausencia de anticuerpos, (B) presencia de anticuerpos control y (C) presencia de anticuerpos antiprolactina

Efecto angiogénico de la prolactina exógena en presencia del suero de pacientes con cáncer colo-rectal

Para corroborar las propiedades angiogénicas de la PRL y la influencia del suero de pacientes con cáncer colo-rectal, llevamos una co-incubación de células endoteliales con concentraciones crecientes de PRL en presencia de una dilución de los diferentes sueros que por sí misma no estimula la proliferación endotelial. Encontramos que la PRL exógena estimuló la proliferación de las células endoteliales solamente en presencia de suero de pacientes con cáncer ($p < 0.01$, ANOVA; Fig. 5A), pero no cuando el cultivo se llevó a cabo con el suero de sujetos control sin cáncer ($p = 0.35$, ANOVA; Fig. 5B).

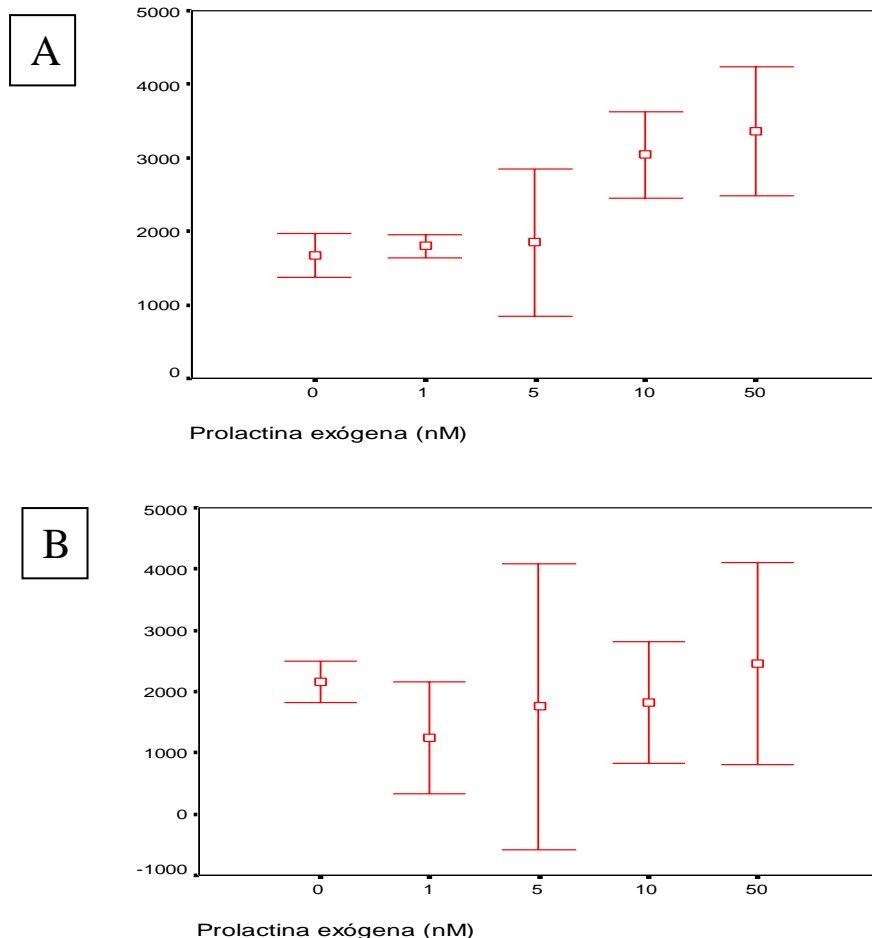


Fig. 6 Proliferación de células endoteliales en respuesta a concentraciones crecientes de PRL exógena en cultivos precondicionados con suero de (A) sujetos control o de (B) pacientes con cáncer.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Nuestro trabajo representa el primer reporte que muestra asociaciones pronósticas opuestas para la PRL en pacientes con cáncer colo-rectal que podrían ser función de la aplicación o no de la radioterapia. Además, obtuvimos resultados que sugieren que estas asociaciones pronósticas pudieran involucrar efectos de la PRL sobre la angiogénesis tumoral.

El papel de la PRL como un marcador pronóstico en el cáncer colo-rectal ya ha sido estudiado previamente. Inicialmente se postuló que los pacientes con cáncer colo-rectal frecuentemente cursan con hiperprolactinemia, y que esta elevación del nivel hormonal circulante correlaciona con un mal pronóstico^{22,23,48}. Sin embargo, reportes posteriores no encontraron la frecuencia de hiperprolactinemia reportada y de hecho cuestionaron el valor pronóstico del nivel hormonal²⁵⁻²⁷. Los resultados del presente trabajo reconcilian ambas observaciones, ya que no muestran que ocurra hiper-prolactinemia en pacientes con cáncer colo-rectal, pero sí que dentro del rango normal las diferencias en nivel de PRL tienen una asociación pronóstica, y que probablemente dependiendo de la administración de radioterapia o no, la correlación pronóstica es en sentido favorable o adverso, respectivamente.

Los niveles de PRL pre-tratamiento estuvieron en un rango normal ($< 20\text{ng/mL}$) y no variaron con la edad o el sexo de los pacientes, ni tampoco con la localización en colon o recto del tumor. En el cáncer de colon, la mayoría de los pacientes con nivel de prolactina en o sobre la percentila 75 ($\geq 12\text{ ng/mL}$) tuvieron enfermedad avanzada (etapa IV TNM), mientras que los pacientes con valores de PRL por debajo de este nivel mostraron una distribución más homogénea entre las etapas TNM. Así, en el grupo de pacientes con

PRL en la parte alta del espectro normal, observamos una sobrevida global más baja que la del grupo con niveles en la parte relativamente baja del espectro. Para el grupo de pacientes con cáncer rectal no se observó la correlación de la PRL con la etapa TNM, y para el subgrupo con PRL relativamente alta se observó una supervivencia global comparativamente mejor que el subgrupo con PRL relativamente baja. Esta asociación opuesta con la supervivencia podría explicar la inconsistencia a este respecto de los hallazgos previos, ya que dichos estudios ubicaron al cáncer colo-rectal como una entidad única^{22-27,48,49}

La asociación de pequeños cambios en la PRL circulante con la progresión de las neoplasias no es nueva. En el estudio de cohorte I de enfermeras de los EUA⁵⁰, las mujeres pos-menopáusicas que desarrollaron cáncer de mama tuvieron una mediana de PRL que fue significativamente mayor que en las mujeres control que no lo desarrollaron (9 vs. 7.9 ng/ml, respectivamente). En este estudio, las mujeres con valores arriba del cuartil mas alto de PRL tuvieron un riesgo de cáncer de mama significativamente mayor que las mujeres por debajo del cuartil menor. En cuanto a las mujeres pre-menopáusicas, el estudio de cohorte II de enfermeras de los EUA⁵¹ los hallazgos fueron muy similares que en el primer estudio, con un nivel de PRL normal pero significativamente mayor entre las mujeres que desarrollaron cáncer de mama en comparación con los controles que no lo desarrollaron (14.9 vs.14.5ng./mL, respectivamente), y de la misma manera el riesgo de cáncer de mama aumentó en asociación a los incrementos cuartil por cuartil de la PRL.

Por lo menos dos mecanismos pueden explicar la asociación entre cambios sutiles de PRL circulante y la enfermedad⁵² El primero es que los tumores colorectales^{23,24}, al igual que otros tumores⁵³⁻⁵⁶, producen PRL. Si las fuentes extra-pituitarias¹⁸ de PRL contribuyen colectivamente con el 10-20% a la PRL circulante, el que el tumor aumente al doble la

producción de PRL puede producir solamente un aumento sutil en los niveles circulantes de la hormona, mientras que dentro del tumor el incremento por sí mismo podría tener mucha significancia. Un segundo mecanismo posible es que la PRL puede corresponder a una variedad de formas modificadas post-traduccionalmente, algunas de las cuales tienen actividades biológicas muy diversas¹¹, y que no son reconocidas igualmente por los inmuno-ensayos clínicos. Así, los pequeños aumentos en PRL circulante pudieran representar niveles más altos de isoformas menos inmuno-reactivas, pero biológicamente activas.

Tanto la localización tumoral como la radioterapia, estrechamente vinculados entre sí, resultaron ser en nuestro análisis factores relacionados al sentido de la asociación pronóstica de la PRL. Al respecto, es posible enunciar algunos elementos que pudieran dar cuenta de esta asociación; en primer lugar, los carcinomas colónicos y los carcinomas rectales tienen entre sí algunas diferencias etiológicas^{57,58} y diferencias clínico-patológicas^{59,60} que se asocian con cambios en el desenlace de la enfermedad. Por otra parte, la RTPRE es un tratamiento que en su modalidad neo-adyuvante se utiliza únicamente en carcinomas rectales y no en los colónicos, factor que pudo haber influido en el desenlace en relación con la PRL; el hallazgo de que la PRL alta correlacionó con mejor pronóstico para los pacientes tratados con RTPRE pero relativamente peor para los pacientes sin tratamiento con RTPRE, inclusive en los pacientes con cáncer de recto sin RTPRE, hace pensar que, o bien las células tumorales que producen PRL o que expresen mas abundantemente el receptor de PRL reciben un daño proporcionalmente mayor con la RTPRE, o bien que la misma PRL circulante puede incrementar el efecto terapéutico de la RTPRE en el cáncer colo-rectal. La PRL puede funcionar como un factor de crecimiento para el cáncer colo-rectal. El receptor de PRL se reportó presente en el 46% de un conjunto

de muestras analizadas de cáncer colo-rectal²³, y de hecho se ha encontrado una sobre-expresión del mismo en tumores, cuando se le compara con la de los tejidos normales²⁴. La PRL estimula la proliferación de las células de la mucosa en el tracto gastro-intestinal⁶¹ e incrementa la síntesis del DNA en líneas células de cáncer colo-rectal²⁴.

Adicionalmente, es posible que la PRL y las vasoinhibinas puedan estimular o inhibir la progresión del cáncer colo-rectal a través de promover o reducir su neovascularización, respectivamente. La PRL estimula la angiogénesis en diversos órganos incluido el ovario³⁹, el testículo⁴⁰ y el corazón⁴¹. Este efecto puede ser indirecto, ya que se ha reportado que la PRL promueve la expresión de factores proangiogenicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor básico de fibroblastos (bFGF) por distintos tipos celulares como en el epitelio mamario⁶², las células de la decidua⁶³, los macrófagos⁶⁴, las células Nb2 derivadas de linfocitos T⁶⁵, etc. Sin embargo también puede actuar directamente sobre las células endoteliales ya que se ha reportado la expresión de sus receptores en el endotelio de diversos lechos vasculares⁶⁶. En el presente trabajo mostramos evidencias de que la PRL presente en el suero de pacientes con cáncer colo-rectal promueve la proliferación de células endoteliales en cultivo. Este efecto depende de la concentración de PRL presente en el suero y es bloqueado por su inmuno-inactivación. Además, la expresión del efecto proangiogénico de la PRL circulante depende del tipo de suero, ya que no se manifestó en presencia del suero de personas sanas. La influencia de la calidad del suero se puso asimismo de manifiesto por el hecho de que solo en presencia de suero de pacientes con cáncer colo-rectal, mas no del suero de los sujetos control, se observó el efecto de la PRL exógena sobre la estimulación de la proliferación de las células endoteliales en cultivo. Estos hallazgos sugieren que existen factores circulantes que regulan la sensibilidad del endotelio a la PRL. En este sentido la regulación de la expresión

del receptor de PRL en células neoplásicas de cáncer de mama ha sido vinculada a la presencia de hormonas esteroides sexuales⁶⁷. Específicamente en el caso del endotelio, en un trabajo reciente se mostro que la incubación con el líquido folicular ovárico estimula la expresión del receptor de PRL en las BUVEC permitiendo la acción proangiogénica de la PRL exógena (Castilla et al, en prensa). Queda por determinar si la presencia diferencial de alguna citocina en el suero de los pacientes con cáncer colo-rectal promueve la expresión de los receptores de PRL y por lo tanto si este mecanismo puede contribuir a la manifestación de sus efectos proangiogénicos.

La asociación de los niveles circulantes más altos de PRL con una menor supervivencia en el grupo de pacientes con cáncer de colon, es consistente con la capacidad de la PRL de estimular la proliferación de las células de cáncer colorectal²⁴ y la angiogénesis^{35,39,66} ambas capaces de favorecer la progresión neoplásica. En contraste, en los pacientes con cáncer rectal RTPRE es posible que la generación de vasoinhibinas a partir de PRL pueda contribuir a explicar la correlación entre los niveles relativamente altos de PRL y la mayor supervivencia. Al respecto se conoce que la inhibición de la angiogénesis aumenta el efecto terapéutico de la radioterapia⁶⁸ y que la RT puede aumentar los niveles circulantes de inhibidores de angiogénesis⁶⁹. En vista de estas posibilidades es de gran interés el valorar la producción de vasoinhibinas y de las enzimas que las producen en el cáncer colo-rectal sometido o no a la RTPRE.

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que la PRL ayuda a conocer el pronóstico de los pacientes con cáncer colo-rectal, específicamente en relación con la radioterapia y con la localización, y que las acciones de la PRL sobre la angiogénesis observadas en este trabajo podrían aclarar las relaciones de la hormona con la progresión del cáncer colo-rectal descritas para esta cohorte, así como en estudios previos en donde la PRL es un factor pronóstico en esta patología. Igualmente sugieren que la PRL influye sobre la progresión neoplásica así como sobre la respuesta tumoral a la radioterapia, y también que un mecanismo a través del que podrían hacerlo es el de la regulación angiogénica.

A la luz de los hallazgos descritos, consideramos que es importante continuar investigando por una parte las asociaciones pronósticas de la PRL con el cáncer en general y con el CRC específicamente, al igual que los mecanismos a través de los que la PRL pudiera estimular o inhibir la progresión del cáncer, específicamente la influencia de la RTPRE en la abundancia relativa de los fragmentos anti-angiogénicos de la PRL a nivel tumoral.

REFERENCIAS

1. OMS: Globalcan, UED Agencia Internacional para la Investigación Contra el Cáncer., 2000
2. Tovar-Guzman V, Flores-Aldana M, Salmeron-Castro J, et al: Epidemiologic panorama of colorectal cancer in Mexico, 1980-1993. *Dis Colon Rectum* 41:225-31, 1998
3. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al: Molecular Classification of Cancer: Class Discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring, 1999, pp 531-537
4. Burke HB: Outcome Prediction and the Future of the TNM Staging System. *J. Natl. Cancer Inst.* 96:1408-1409, 2004
5. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al: Molecular portraits of human breast tumours, 2000, pp 747-52
6. Arango D, Laiho P, Kokko A, et al: Gene-expression profiling predicts recurrence in Dukes' C colorectal cancer, 2005, pp 874-84
7. Watanabe T, Komuro Y, Kiyomatsu T, et al: Prediction of Sensitivity of Rectal Cancer Cells in Response to Preoperative Radiotherapy by DNA Microarray Analysis of Gene Expression Profiles, 2006, pp 3370-3374
8. Eschrich S, Yang I, Bloom G, et al: Molecular Staging for Survival Prediction of Colorectal Cancer Patients, 2005, pp 3526-3535
9. Truong A, Duez C, Belayew A, et al: Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J* 3:429-437, 1984
10. Sinha Y: Cleaved Prolactin: Evidence for its Occurrence in Human Pituitary Gland and Plasma. *J. Clin. Endoc. Metab.* 60:239-243, 1985
11. Sinha Y: Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 16:354-369, 1995
12. Peers B, Voz M, Monget P, et al: Regulatory elements controlling pituitary-specific expression of the human prolactin gene. *Mol. Cell Biol.* 10:4690-4700, 1990
13. Berwaer M, Martial J, Davis J: Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. *Mol. Endocrinol.* 8:635-642, 1994
14. Goffin V, Shiverick K, Kelly P, et al: Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocr Rev* 17:385-410, 1996
15. Horseman N, Yu-Lee L: Transcriptional regulation by the heilx bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hepatopoietic cytokines. *Endocr. Rev.* 15:627-649, 1994
16. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, et al: Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice, *Endocr Rev*, 1998, pp 225-268
17. Goffin V, Binart N, Touraine P, et al: PROLACTIN: The New Biology of an Old Hormone. *Annu. Rev. Physiol.* 64:47-67, 2002
18. Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, et al: Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Reviews* 17:639-69, 1996

19. Clapp C, Thebault S, Martinez de la Es G: Role of prolactin and vasoinhibins in the regulation of vascular function in mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13:55-67, 2008
20. Stattin P, Rinaldi S, Stenman UH, et al: Plasma prolactin and prostate cancer risk: A prospective study. *International Journal of Cancer* 92:463-5, 2001
21. Hankinson S, Willet W, Michaud D, et al: Plasma Prolactin Levels and Subsequent Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women. *J Natl Cancer Inst* 91:629-634, 1999
22. Patel DD: Plasma Prolactin in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer* 73:570-574, 1994
23. Bhatavdekar JM, Patel D, Chikhlikar P, et al: Ectopic Production of Prolactin by Colorectal Adenocarcinoma. *Diseases of The Colon and Rectum* 44:119-127, 2001
24. Otte JM, Otte C, Beckedorf S, et al: Expression of functional prolactin and its receptor in human colorectal cancer. *International Journal of Colorectal Disease* 18:86-94, 2003
25. Baert D, Matthys C, Gillardin J, et al: Prolactin and colorectal cancer: is there a connection? *Acta gastroenterol. belg.* 61:407-409, 1998
26. Carlson HE, Zarrabi MH, Lyubsky SL: Lack of association between hyperprolactinemia and colon carcinoma. *Cancer Investigation* 18:130-4, 2000
27. Indinnimeo M, Cicchini C, Memeo L, et al: Plasma and tissue prolactin detection in colon carcinoma. *Oncology Reports* 8:1351-3, 2001
28. Carmeliet P, Jain R: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-257, 2000
29. Folkman J: The role of angiogenesis in tumor growth. *Seminars in Cancer Biology* 3:65-71, 1992
30. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70, 2000
31. Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-64, 1996
32. Corbacho A, de la Escalera G, Clapp C: Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J. Endocrinol.* 173:219-238, 2002
33. Clapp C, Weiner R: A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* 130:1380-1386, 1992
34. Clapp C, Martial J, Guzman R, et al: The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133:1292-1299, 1993
35. Struman I, Bentzien F, Lee H, et al: Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: An efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *PNAS* 96:1246-1251, 1999
36. Clapp C, Aranda J, Gonzalez C, et al: Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab* 17:301-7, 2006
37. Gonzalez C, Corbacho AM, Eiserich JP, et al: 16K-Prolactin Inhibits Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase, Intracellular Calcium Mobilization, and Endothelium-Dependent Vasorelaxation. *Endocrinology* 145:5714-5722, 2004

38. Garcia C, Aranda J, Arnold E, et al: Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest* 118:2291-300, 2008
39. Gaytan F, Morales C, Bellido C, et al: Role of prolactin in the regulation of macrophages and in the proliferative activity of vascular cells in newly formed and regressing rat corpora lutea. *Biol Reprod* 57:478-486, 1997
40. Ko JY, Ahn YL, Cho BN: Angiogenesis and white blood cell proliferation induced in mice by injection of a prolactin-expressing plasmid into muscle. *Mol Cells* 15:262-70, 2003
41. Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E, et al: A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 128:589-600, 2007
42. Clapp C, López-Gómez J, Nava G, et al: Expression of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endothelial cells: evidence for autocrine effects. *J. Endocrinol.* 158:137-144, 1998
43. Corbacho A, Macotela Y, Nava G, et al: Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J. Endocrinol.* 166:53-62, 2000
44. Babson AL, Olson DR, Palmieri T, et al: The IMMULITE assay tube: a new approach to heterogeneous ligand assay. *Clin Chem* 37:1521-1522, 1991
45. Barrera MG, Trejo B, Luna-Perez P, et al: Opposite association of serum prolactin and survival in patients with colon and rectal carcinomas: influence of preoperative radiotherapy. *Dig Dis Sci* 51:54-62, 2006
46. Duenas Z, Rivera JC, Quiroz-Mercado H, et al: Prolactin in Eyes of Patients with Retinopathy of Prematurity: Implications for Vascular Regression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45:2049-2055, 2004
47. Carley WW, Niedbala MJ, Gerritsen ME: Isolation, cultivation, and partial characterization of microvascular endothelium derived from human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:620-30, 1992
48. Bhatavdekar J, Patel D, Ghosh N, et al: Interrelationship of prolactin and its receptor in carcinoma of colon and rectum: a preliminary report. *Journal of Surgical Oncology* 55:246-9, 1994
49. Ilan Y, Sibirsky O, Livni N, et al: Plasma and Tumor Prolactin in Colorectal Cancer Patients. *Digestive Diseases and Sciences* 40:2010-2015, 1995
50. Tworoger SS, Eliassen AH, Rosner B, et al: Plasma Prolactin Concentrations and Risk of Postmenopausal Breast Cancer. *Cancer Res* 64:6814-6819, 2004
51. Tworoger SS, Sluss P, Hankinson SE: Association between Plasma Prolactin Concentrations and Risk of Breast Cancer among Predominately Premenopausal Women. *Cancer Res* 66:2476-2482, 2006
52. Xu X, Kreye E, Kuo CB, et al: A Molecular Mimic of Phosphorylated Prolactin Markedly Reduced Tumor Incidence and Size When DU145 Human Prostate Cancer Cells Were Grown in Nude Mice. *Cancer Res* 61:6098-6104, 2001
53. Yamauchi T, Yamauchi N, Ueki K, et al: Constitutive Tyrosine Phosphorylation of ErbB-2 via Jak2 by Autocrine Secretion of Prolactin in Human Breast Cancer. *J. Biol. Chem.* 275:33937-33944, 2000
54. Stanisc TH, Donovan J: Prolactin secreting renal cell carcinoma. *Journal of Urology* 136:85-6, 1986
55. Hsu CT, Yu MH, Lee CY, et al: Ectopic production of prolactin in uterine cervical carcinoma. *Gynecologic Oncology* 44:166-71, 1992

56. Hoffman WH, Gala RR, Kovacs K, et al: Ectopic prolactin secretion from a gonadoblastoma. *Cancer* 60:2690-5, 1987
57. Slattery ML, Samowitz W, Curtin K, et al: Associations among IRS1, IRS2, IGF1, and IGFBP3 Genetic Polymorphisms and Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:1206-1214, 2004
58. Diep CB, Thorstensen L, Meling GI, et al: Genetic Tumor Markers With Prognostic Impact in Dukes' Stages B and C Colorectal Cancer Patients. *J Clin Oncol* 21:820-829, 2003
59. Kapiteijn E, Liefers GJ, Los LC, et al: Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. *J Pathol* 195:171-8, 2001
60. Frattini M, Balestra D, Suardi S, et al: Different Genetic Features Associated with Colon and Rectal Carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 10:4015-4021, 2004
61. Kagnoff MF: Immunology of the intestinal tract. *Gastroenterology* 105:1275-80, 1993
62. Goldhar AS, Vonderhaar BK, Trott JF, et al: Prolactin-induced expression of vascular endothelial growth factor via Egr-1. *Mol Cell Endocrinol* 232:9-19, 2005
63. Srivastava RK, Gu Y, Ayloo S, et al: Developmental expression and regulation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in rat decidua and in a decidual cell line. *J Mol Endocrinol* 21:355-362, 1998
64. Malaguarnera L, Pilastro MR, Quan S, et al: Significance of heme oxygenase in prolactin-mediated cell proliferation and angiogenesis in human endothelial cells. *Int J Mol Med* 10:433-40, 2002
65. Too CK, Knee R, Pinette AL, et al: Prolactin induces expression of FGF-2 and a novel FGF-responsive NonO/p54nrb-related mRNA in rat lymphoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 137:187-95, 1998
66. Ricken AM, Traenkner A, Merkwitz C, et al: The short prolactin receptor predominates in endothelial cells of micro- and macrovascular origin. *J Vasc Res* 44:19-30, 2007
67. Ormandy CJ, Hall RE, Manning DL, et al: Coexpression and Cross-Regulation of the Prolactin Receptor and Sex Steroid Hormone Receptors in Breast Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3692-3699, 1997
68. Mauceri HJ, Hanna NN, Beckett MA, et al: Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumour therapy. *Nature* 394:287-91, 1998
69. Hartford AC, Gohongi T, Fukumura D, et al: Irradiation of a Primary Tumor, Unlike Surgical Removal, Enhances Angiogenesis Suppression at a Distal Site: Potential Role of Host-Tumor Interaction. *Cancer Res* 60:2128-2131, 2000