



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

**“Diferencias en el grado de expresión de PTP-1B en pacientes con cáncer de
próstata con y sin factores patológicos adversos”**

MODALIDAD DE GRADUACIÓN: *TESIS*

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA

MARIA TERESA BOURLON DE LOS RÍOS

TUTOR

DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE 2016



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.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo incondicional y por impulsarme a ser mejor persona a diario.

Al Dr. Eucario León Rodríguez por su exigencia que me hace dar lo mejor de mí y por sus enseñanzas.

A la Dra. María Guadalupe Jazmín de Anda González por fungir como mi co-tutora, por su tiempo y por su paciencia para asesorarme y apoyarme en el procesamiento de las muestras.

Al Dr. Yemil Atisha Fragoso por su gran asesoría metodológica de la investigación y estadística.

A la Dra. Shaddai Urbina Ramírez por su entusiasmo y aportación invaluable para llevar a cabo este estudio.

Al Dr. Mauricio de Jesús Mora Pineda, por su trabajo durante todo este año y su compromiso con el servicio de Oncología.

A los pacientes que son la principal razón de nuestros esfuerzos.

COMITÉ TUTORAL

Tutor

Dr. Eucario León Rodríguez

Coordinador del Departamento de Hematología-Oncología
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Co-Tutora

Dra. María Guadalupe Jazmín de Anda González

Médico adscrito al Departamento de Patología
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

COMITÉ DE SINODALES

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Coordinador de la Unidad de Bioquímica
Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. David Cruz Robles

Departamento de Biología Molecular
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle

Investigador en Ciencias Médicas
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dr. Gregorio Tomás Obrador Vera

Director de la Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Panamericana

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Cáncer de próstata.....	4
2.2 Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina.....	5
2.2.1 Proteínas fosfatasa de tirosina.....	6
2.2.2 Características de PTP-1B.....	7
2.2.3 Papel de PTP-1B en cáncer.....	8
2.2.4 PTP-1B en cáncer de próstata.....	10
3. DEFINICIÓN DE PROBLEMA.....	11
4. JUSTIFICACIÓN.....	11
5. HIPÓTESIS.....	12
6. OBJETIVO.....	12
6.1 Objetivo principal.....	12
6.2 Objetivos secundarios.....	12
7. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	12
8. MATERIAL Y MÉTODOS	13
8.1 Identificación de casos	13
8.2 Recolección de variables y desenlaces.....	14
8.3 Construcción de microarreglos de tejido (TMA).....	16

8.4 Lectura de grado de expresión de PTP-1B por inmunohistoquímica.....	20
8.5 Análisis estadístico.....	24
8.6 Cálculo del tamaño de muestra.....	25
9. RESULTADOS.....	26
9.1 Identificación de casos.....	26
9.2 Características de los pacientes.....	28
9.3 Expresión de PTP-1B CON y SIN factores patológicos adversos.....	32
9.4 Análisis de correlación.....	33
9.5 Análisis de regresión logística.....	34
9.5 Análisis de supervivencia.....	36
10. DISCUSIÓN.....	38
11. CONCLUSIONES.....	42
12. BIBLIOGRAFÍA.....	43

1. RESUMEN

Introducción: El cáncer de próstata localizado es una enfermedad heterogénea, los pacientes con factores patológicos adversos en la pieza quirúrgica requerirán radioterapia adyuvante. No existen marcadores clínicos suficientes para predecir antes de la cirugía radical la presencia factores patológicos adversos. La forforilación de proteínas en residuos de tirosina es una modificación postraducciona que regula efectos biológicos como *proliferación, diferenciación, migración y muerte celular*. La fosfatasa, PTP-1B, podría tener un papel biológico en migración e invasión del cáncer de próstata y podría ser un predictor de la presencia de factores patológicos adversos.

El objetivo principal fue comparar el grado de expresión de PTP-1B cuantificada por medio de inmunohistoquímica en pacientes CON vs SIN factores patológicos adversos. Los objetivos secundarios fueron correlacionar el Score de PTP-1B con el APE pre-quirúrgico y la escala de Gleason, evaluar la sobrevida cáncer específica de acuerdo al score de PTP-1B e identificar a PTP-1B como factor pronóstico independiente.

Material y métodos: Se identificaron los casos de cáncer de próstata (1990 a 2015) sometidos a prostatectomía radical con información clínica y patología completa en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). A partir de las muestras de patología se construyeron microarreglos de tejido (TMA Tissue Microarray) para la tinción de

inmunohistoquímica para PTP-1B y se calificaron con un score de lectura del 0 al 9. Este resultado se comparó entre pacientes con y sin datos de mal pronóstico.

En el análisis estadístico se utilizó la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney para la comparación de dos grupos independientes. Se utilizó la prueba de Spearman para correlación. Se realizó un análisis de regresión logística con dos modelos, uno para identificar la independencia de variables biológicamente asociadas (metformina y DM2) y el segundo para buscar independencia de factores de riesgo previamente identificados (Gleason y APE). Se utilizó el programa SPSS versión 22.0 (IBM corp). Se planeó un reclutamiento de 206 sujetos para identificar una diferencia estadísticamente significativa en las variables objetivo primario del estudio. Se programó un análisis intermedio por conveniencia después de 18 meses.

Resultados: Se identificaron 1513 casos, 352 tuvieron información clínica y material de patología completo. El 46.59% (164) correspondieron a casos sin factores patológicos adversos, mientras que el 53.4% (188) no presentaron factores patológicos adversos. Después de 18 meses, se analizaron 190 muestras por patología, y se obtuvieron 73 casos para lectura del TMA, con una edad promedio de 62 ± 6.9 años. Veintinueve casos (40%) SIN factores patológicos adversos y a 44 (60%) CON factores patológicos adversos. La mediana [IQR] del Score de PTP-1B en el grupo SIN factores patológicos adversos fue de 5 [3 - 8] vs 8 [5 - 9] en el grupo CON factores patológicos ($p=0.026$). La prueba de correlación de Spearman entre el score de PTP-1B y la escala de Gleason mostró una $r=0.24$ ($p=0.042$). La correlación con el nivel de APE fue $r=0.243$ ($p=0.046$).

En el modelo de regresión logística incluyendo las variables confusoras de DM2 y uso de metformina, el score de PTP-1B mantuvo significancia estadística (OR 1.21, IC 95% 1.01- 1.45, $p=0.037$). En el segundo modelo que incluyó el APE quirúrgico y puntaje de Gleason; el score de PTP-1B no mostró independencia sobre los otros factores de riesgo (OR 1.68, IC 95% 0.97-1.41, $p=0.11$).

El área bajo la curva del modelo para predecir la presencia de factores patológicos adversos incluyendo solamente el score de PTP-1B fue de 0.65 (IC 95% 0.52-0.78; $p=0.03$), al incluir APE + Gleason + score de PTP-1B fue de 0.73 (IC 95% 0.61-0.84; $p=0.001$) e incluyendo APE + Gleason 0.71 (IC 95% 0.59-0.82; $p=0.03$).

El análisis de supervivencia cáncer específica por Regresión de Cox de acuerdo a la expresión de PTP-1B >5 vs ≤ 5 puntos no mostraron diferencias estadísticamente significativas (HR de 3.29; IC 95% 0.37-29.79; $p=0.28$).

Conclusión: Los pacientes que tienen factores patológicos adversos tienen mayor expresión de la fosfatasa PTP-1B.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Cáncer de próstata

El cáncer de próstata es la neoplasia más frecuente en hombres.(1) La mayoría de los casos se diagnostican en etapas tempranas. Estas se dividen en lesiones de riesgo bajo, intermedio o alto (2). A mayor riesgo existe mayor probabilidad de extensión local de la enfermedad y que un tratamiento quirúrgico no sea suficiente para erradicar la enfermedad. Con base en ello, actualmente el uso combinado de radioterapia más hormonoterapia se considera un tratamiento de elección para pacientes de alto riesgo. Para las lesiones de riesgo intermedio y bajo, la cirugía sigue siendo una opción de tratamiento para quienes no son candidatos a vigilancia activa (3). Una fracción de estos pacientes puede presentar en la patología quirúrgica: bordes quirúrgicos positivos, invasión extra-capsular o invasión a las vesículas seminales. La presencia de estos factores habitualmente advierte que la cirugía por sí sola no será una suficiente para la curación y obliga a considerar tratamiento adyuvante con radioterapia, lo cual incrementa la toxicidad genitourinaria y gastrointestinal de los pacientes (4-6).

Se han estudiado múltiples factores clínicos como predictores de factores patológicos adversos; tales como el nivel de antígeno prostático específico (APE), el patrón de Gleason y el estadio tumoral clínico. Sin embargo, el cáncer de próstata es una enfermedad muy heterogénea y a pesar de haberse construido normogramas para predecir aquellos que presentarán patología adversa estos no logran identificar aquellos pacientes con enfermedad agresiva.

A pesar de ser una neoplasia indolente y que se cuenta con un tratamiento local efectivo para etapas tempranas, el cáncer de próstata es aún la primera causa de muerte en hombres en México. Esta discrepancia, es resultado de la ausencia de marcadores capaces de discriminar los tumores indolentes de aquellos agresivos.

2.2 Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina

La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina es una de las modificaciones postraduccionales más importantes que las células utilizan para regular respuestas celulares. La regulación de este proceso es crucial para varios efectos biológicos que incluyen la proliferación, diferenciación, migración y muerte celular. Además, representa un punto de control para la integración de señales extracelulares y su conversión en respuestas celulares. Los niveles de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina se encuentran estrechamente controlados por una acción coordinada de dos tipos de enzimas llamadas proteínas tirosinas cinasas (PTK, del inglés protein tyrosine kinase) y las proteínas fosfatasas de tirosina (PTP, del inglés protein tyrosine phosphatase) (7).

Las PTK's se encargan de añadir un grupo fosfato sobre residuos de tirosina de proteínas sustrato causando un cambio estructural y promoviendo las interacciones entre proteínas en las cascadas de señalización celular. La acción de las PTK's es regulada por la acción de las PTP's, las cuales se encargan de remover un grupo fosfato de un residuo de tirosina de una proteína sustrato. La alteración del balance normal entre la actividad de las PTK's y PTP's resulta en una fosforilación aberrante de residuos de tirosina, la cual ha sido ligada a la

etiología de varias enfermedades, incluyendo el cáncer y particularmente cáncer de próstata.(8-10)

2.2.1 Proteínas fosfatasas de tirosina

El genoma humano codifica 107 PTP's, que conforman a la superfamilia de las fosfatasas. Esta superfamilia es estructuralmente diversa, y tiene efectos tanto estimulatorios como inhibitorios(11-13). Las PTP's se dividen en dos tipos: receptores y no receptores. Las PTP's tipo receptor contienen variables dominios extracelulares, un dominio único transmembrana y un dominio intracelular con actividad catalítica. Este dominio catalítico contiene aproximadamente 280 aminoácidos y presentan un residuo de cisteína conservado que es necesario para la actividad catalítica. La defosforilación de los sustratos ocurre con alto grado de especificidad, a través de un mecanismo de dos pasos que consiste en la formación de un intermediario que se forma a través de un enlace covalente de fosfato-PTP que subsecuentemente se hidroliza (14). La función principal de las PTP's es revertir la acción de fosforilación de las PTK's. Sin embargo, las PTP's también pueden potenciar acciones de las PTK's; de este modo se aumentan las señales mitogénicas conduciendo a transformación y proliferación celular (15). Algunos miembros de la superfamilia de las fosfatasas son productos de genes supresores tumorales, entre los que se encuentran principalmente PTEN, cuya pérdida se ha asociado a enfermedad no órgano-confinada tras la realización de prostatectomía radical(16, 17).

2.2.2 Características de PTP-1B

Las primeras fosfatasa del tipo no receptor identificadas fueron PTP1B (PTPN1) y TC-PTP (PTPN2) (7). PTP1B es una proteína que fue purificada de una librería de placenta humana, se encuentra localizada en el cromosoma 20 específicamente en la región q13.1-q13.2. Esta enzima está formada por 435 aminoácidos con un peso de 50 kDa, contiene un dominio catalítico de 37 kDa hacia su extremo N-terminal, que está flanqueado por dos dominios ricos en prolina y un dominio en el C-terminal que le permite el anclaje de la enzima a la cara citoplasmática del retículo endoplásmico (9, 10). La actividad catalítica de esta enzima está controlada por su localización en la superficie del retículo endoplásmico, ya que esto restringe su acceso a los sustratos. Además, existen otros cuatro mecanismos que operan en tándem para regular la actividad de PTP1B, que son la oxidación, la fosforilación, sumoilación y proteólisis (18).

Diversos estudios han demostrado que PTP1B juega un papel clave en la señalización de vías metabólicas y es un blanco terapéutico prometedor para la diabetes mellitus y la obesidad, ya que esta proteína participa en la regulación negativa en la señalización de los receptores de la insulina y la leptina. La delección del gen de *ptpn1* en ratones causa hipersensibilidad a la insulina y está asociada con un incremento marcado de la fosforilación de tirosina del receptor de insulina y sus blancos (19, 20). La PTP1B también puede inhibir la señalización de otros PTK's tales como los receptores de PDGF y HGF (21), mientras que la sobreexpresión de PTP1B en fibroblastos inhibe la transformación por oncogenes que incrementan la

fosforilación de tirosinas incluyendo Her2, Src, Bcr-Acl, Crk y Ras62-64. También es requerida para la activación de las GTPasas de Rac y Ras (enzimas asociadas con incremento de proliferación y motilidad celular). Además, también puede activar a Src mediante defosforilación de la tirosina 527 (Y527), localizado hacia el extremo carboxilo terminal de la cinasa (22, 23).

2.2.3 Papel de PTP-1B en cáncer

La PTP1B se encuentra localizada dentro de un mapa genético en el cromosoma 20 en la región q13.1-q13.268-69. Se ha demostrado que la ganancia o amplificación de la región del cromosoma 20q13 está asociada a pobre pronóstico en cáncer de mama; no obstante, no existen datos que evalúen la sobreexpresión de PTP1B en neoplasias malignas como factor condicionante de pobre pronóstico. Las fosfatasa que se han documentado con un papel pronóstico en cáncer, es la fosfatasa PRL-3, que se ha asociado a una menor supervivencia libre de progresión en cáncer de mama ganglios positivos(24). Esto es contrario a lo que inicialmente se pensó que tenían propiedades anti-oncogénicas a través de la regulación negativa de la actividad oncogénica de las PTK's. Sin embargo, datos recientes han demostrado que estas fosfatasa se encuentran involucradas en la regulación positiva de vías de señalización en cáncer. La PTP1B es un regulador positivo de la señalización Ras, lo cual fue demostrado en fibroblastos deficientes de PTP1B72. Estudios recientes han demostrado que PTP1B participa en la vía de Her2 en la iniciación de la tumorigénesis

en cáncer de mama. La inhibición de la expresión de PTP1B fue asociada con la disminución de la fosforilación de Erk, sugiriendo que PTP-1B funge como regulador de varias vías de señalización metabólica.

En la línea de investigación de que se lleva a cabo en conjunto con el Laboratorio de Bioquímica. Se disecado el papel de esta fosfatasa en cáncer de mama. Interesantemente, se demostró que el silenciamiento de PTP-1B en cultivos primarios de cáncer de mama disminuye la proliferación y migración celular(25). Adicionalmente, se demostró que PTP-1B modula la expresión de receptores de factores de crecimiento (Her2 y PDGFR- β). La expresión de PTP-1B se ha reportado como un factor pronóstico independiente de supervivencia en pacientes con cáncer de mama(26). Recientemente se reportó que la amplificación de PTP-1B se asocia a pobre sobrevida en pacientes con cáncer gástrico y a un fenotipo invasivo y de mal pronóstico en cáncer colorrectal. (27, 28)

Otros casos de cáncer en que se ha relacionado que PTP-1B puede actuar como promotor de la progresión tumoral son cáncer de colon y cáncer de pulmón de células no pequeñas. Sin embargo, en otros como cáncer de esófago y en los linfomas actúa como un supresor tumoral. Algunos autores afirman que estos hallazgos sugieren que PTP-1B funciona como una molécula de “doble cara” en cuanto a su relación con los tumores (29).

Particularmente en relación al cáncer de pulmón de células no pequeñas, se ha determinado que PTP-1B promueve la proliferación y metástasis por medio de la activación de diversas cinasas como src y ERK1/2, hallazgos que podrían ser la base para el diseño de farmacoterapia dirigida(29).

2.4 PTP-1B en cáncer de próstata

Un mecanismo poco explorado en cáncer de próstata es la regulación la fosforilación de tirosinas por PTP's(30). Sin embargo, recientemente se ha descrito que el gen PTPN1 es un blanco transcripcional directo del receptor de andrógenos y se induce al estimular el receptor. La estimulación del receptor de andrógenos incrementa la expresión de PTP-1B. En tumores metastásicos se ha encontrado la co-amplificación del gen PTPN1 (gen que codifica para la proteína PTP-1B) y el gen del receptor de andrógenos (RA). En tumores primarios se encontró una relación entre la expresión de PTP1B, la localización nuclear del receptor de andrógenos y el % de Ki67. Adicionalmente, la amplificación de PTPN1 se asoció a tumores primarios de alto riesgo(31).

Estudios funcionales en líneas celulares de cáncer de próstata revelaron que la depleción de PTP-1B retrasa el crecimiento tumoral dependiente de andrógenos y altera la migración e invasión in vitro. Adicionalmente, PTP-1B es también necesario para para la migración de células independientes de andrógenos (siempre y cuando expresen el receptor de andrógenos). Hasta el momento, se desconoce si es que la expresión de PTP-1b difiere en pacientes con cánceres de próstata más agresivos y que presentarán factores patológicos adversos si se someten a una prostatectomía(19, 31).

Por otro lado, se ha descrito que la presencia de PTP-1B juega un rol importante en la diferenciación neuroendócrina del cáncer de próstata. Esta

característica está relacionada con peor pronóstico y mayor posibilidad de metástasis.(32)

Se han explorado modelos en base a kits de inmunohistoquímica con el fin de añadir mayor información pronóstica a los marcadores clínicos establecidos. La pérdida de PTEN, la expresión de MYC y mayor K67 en tejido prostático se asoció a una peor sobrevida libre de progresión en pacientes con cáncer de próstata que recibieron quimioterapia adyuvante con Docetaxel posterior a la prostatectomía.(33)

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El cáncer de próstata es una enfermedad heterogénea, los marcadores clínicos han sido insuficientes para predecir el riesgo de factores patológicos adversos antes de la cirugía. Se requieren de elementos adicionales a los clínicos que ayuden a discernir aquellos pacientes en alto riesgo de presentarlos.

4. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento el papel de PTP1B en cáncer de próstata solo ha sido evaluado en estudios de laboratorio. Se ha documentado que promueve el crecimiento, progresión y migración celular. En este estudio se pretende evaluar la correlación de este marcador con factores patológicos adversos en muestras de prostatectomía radical de significancia clínica.

5. HIPÓTESIS

Existe diferencia significativa al comparar la escala de tinción de inmunohistoquímica de PTP-1B de muestras de prostatectomía de pacientes con factores patológicos adversos al compararlos con las de pacientes sin factores patológicos adversos.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo principal

Comparar el grado de expresión de PTP1B cuantificada por inmunohistoquímica en pacientes con factores patológicos no adversos vs aquellos que presentan factores patológicos adversos.

6.2 Objetivos secundarios

- I. Establecer la correlación entre el valor de PTP-1B y el valor de APE pre-quirúrgico.
- II. Establecer la correlación de PTP-1B y el valor de la escala de Gleason.
- III. Establecer diferencias de acuerdo a la supervivencia global y cáncer específica de acuerdo a la escala de tinción de PTP-1B
- IV. Evaluar a PTP-1B como factor pronóstico independiente.

7. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio comparativo, transversal y retrolectivo.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Identificación de casos

Se identificaron todos los casos incidentes con diagnóstico de cáncer de próstata (1990 a 2015) que fueron sometidos a prostatectomía radical con información clínica y patología completa en el INCMNSZ.

8.1.1 Criterios de inclusión: Se incluyeron los datos clínicos y especímenes de prostatectomía radical correspondientes a:

- Pacientes vistos en el INCMNSZ del 1° de enero de 1990 al 31 de diciembre de 2015.
- Pacientes con documentación patológica de cáncer primario de próstata de subtipo acinar.
- Pacientes de edad mayor a 18 años.
- Pacientes sin evidencia de enfermedad metastásica al momento de la prostatectomía.
- Pacientes sin uso de terapia neo-adyuvante previa a la cirugía.

8.1.2 Criterios de exclusión: Se excluyeron los pacientes que no contaban con la información clínica necesaria en el expediente y cuyo tejido de histopatología que no se encuentre en el archivo de patología para revisión.

8.1.3 Criterios de eliminación: Se excluyó a los pacientes cuyo tejido disponible no fue suficiente para realizar microarreglo de tejidos y tinción para PTP1B.

8.2 Recolección de variables y desenlaces

Recolección de datos clínicos: los datos clínicos fueron obtenidos del expediente clínico del paciente. Vertidos en una hoja de recolección de datos y posteriormente en una base de datos en el programa Excel. A partir de esta fueron integrados al programa estadístico para análisis de los datos.

Se consignaron las siguientes variables:

- *Edad:* se consignará esta variable al día de la prostatectomía medida en años.
- *APE prequirúrgico:* medido en ng/ml previo a la cirugía (en un rango de tiempo no mayor a 3 meses).
- *Diabetes mellitus:* se considerará como una variable dicotómica. Si se encuentra consignada en el expediente como diagnóstico previo a la prostatectomía o no.
- *Etapa clínica:* etapa de la enfermedad por patología de acuerdo a la clasificación TNM de acuerdo a la versión 7.0 de la AJCC.
 - Tumor (T): T1, T2, T3, T4.
 - Ganglios linfáticos (N): N0 o N1.
 - Metástasis (M): M0 o M1.
- *Factores patológicos adversos:* La lectura se realizará de acuerdo a las guías de manejo de especímenes de prostatectomía de Sociedad de Urología Patológica Internacional. Esta variable se dicotomizará esta variable en individuos: “con factores patológicos adversos” (con la presencia

de cualquiera de los tres factores mencionados) y “sin factores patológicos adversos” (ausencia de los tres factores mencionados).

1. Extensión extra-prostática (penetración capsular, invasión capsular o perforación capsular): Se considera positivo cuando se documenta tumor más allá de la próstata. De acuerdo a la diferente localización de la extensión existen criterios pre-definidos para dictaminar extensión fuera del órgano.
2. Invasión a vesículas seminales: Se considera presente cuando se visualiza tumor en las vesículas seminales.
3. Márgenes quirúrgicos positivos: Para esta evaluación se requiere entintar el espécimen completo. Se considera positivo cuando existe tumor en contacto con la tinta.

- *Escala de Gleason*: Identifica el grado tumoral de acuerdo al patrón predominante con un puntaje primario (1 al 5), se otorga un puntaje secundario (1 al 5) para el patrón que le sigue en frecuencia. La suma de ambos (2 al 9). La lectura se realiza en base al consenso internacional de uro-patólogos(34-36).

- *Porcentaje tumoral*: se designa como un porcentaje en cada laminilla perteneciente a cada bloque de parafina y se calcula un promedio de acuerdo a lo definido por el grupo de los Veteranos(35, 36).

- *Tiempo de supervivencia*: tiempo transcurrido desde la prostatectomía hasta la muerte.

- *Causa de muerte*: registro de la causa de muerte fuera el propio cáncer u otra.

Recolección de datos patológicos y de la inmuno-tinción para PTP1B: los datos clínicos de la lectura de patología fueron registrados en la libreta de patología para cada muestra. Posteriormente se registraron en la base de datos en el programa Excel e integrados al programa estadístico para el análisis.

- El desenlace primario fue el grado de expresión de PTP-1B de acuerdo a la escala de lectura de inmunotinción en un grado del 0 al 9 (de acuerdo a la técnica descrita en la sección posterior).

8.3 Construcción del microarreglos de tejido (TMA)

Para la construcción de TMA se realizó el siguiente procedimiento para cada muestra.

- a) Evaluación de las laminillas con tinción de Hematoxilina y Eosina seleccionadas de cada caso completo de prostatectomía.
- b) Selección del área de estudio señalada con marcador indeleble (rosa) sobre la laminilla original. Se seleccionaron dos áreas representativas de cada caso, las cuales debieron contar con las siguientes características:
 - Mayor volumen tumoral de cada patrón de Gleason
 - Sin necrosis
 - Sin inflamación
 - Sin fibrosis o desmoplasia



Imagen 1.0 Selección de área de estudio del tejido con cáncer de próstata.

- c) Las zonas seleccionadas fueron cotejadas en el bloque y posteriormente procesada para el microarreglo.
- d) Se realizó de manera manual la extracción del material del bloque de parafina mediante Trucut.
- e) Se procedió a colocar el tejido seleccionado en las bases para microarreglos y se anotó la localización específica de cada caso. Se construyó el mapa de lectura del microarreglo con base a columnas y filas que identificaron perfectamente el caso analizado.

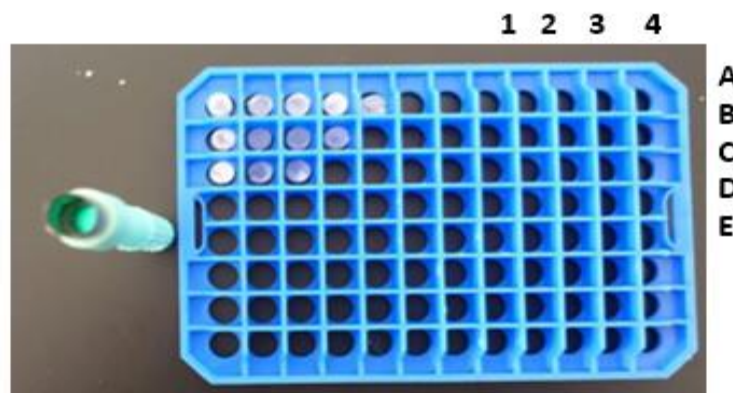


Imagen 2.0 Trucut y rejilla para formar el MAT.

- f) Se vertió parafina para formar el nuevo bloque de inclusión de los tejidos con el material seleccionado. Se dejó en frío a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por una hora.



Imagen 3.0 Acercamiento del molde



Imagen 4.0 Bloque de parafina con las muestras ya incluidas.

- g) Se construyó un bloque de parafina con las muestras incluidas y se quitó la base en que fueron colocados los casos.



Imagen 5.0 Bloque de parafina para evaluación.

- h) Se realizó corte por medio de sacabocado y tinción con Hematoxilina y Eosina del bloque de parafina con los tejidos seleccionados.
- i) Se reevaluaron las muestras obtenidas para corroborar la integridad de la muestra y que el material fuera adecuado mediante el microscopio Nikon eclipse 80i. Se confirmó que cada tejido correspondiera a neoplasia y el Gleason seleccionado en el material completo, comprobando que contara con las condiciones previamente establecidas, fijando como objetivo, tener al menos 30 células neoplásicas
- j) Se aseguró que cada microarreglo contara con al menos dos casos con tejido prostático normal, Neoplasia Intraepitelial Prostática o hiperplasia como control interno para evaluar el anticuerpo.

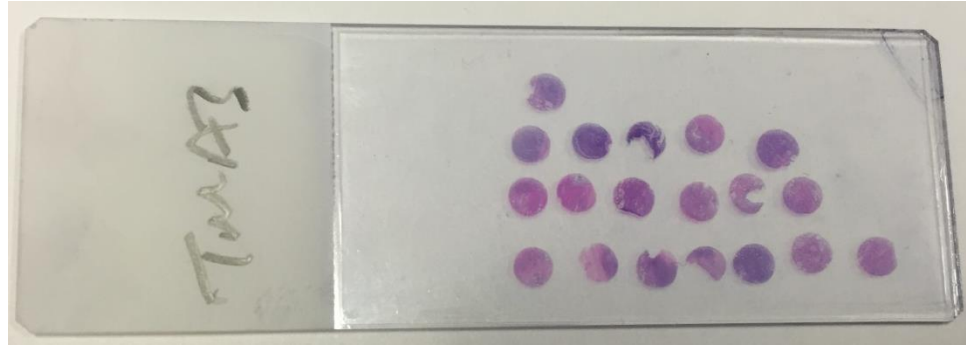


Imagen 6.0 Construcción del MAT y evaluación de la integridad del tejido.

8.4 Lectura de grado de expresión de PTP-1B por inmunohistoquímica

El procedimiento de inmunohistoquímica para PTP-1 se realizó de acuerdo a la siguiente técnica.

- a) Al material seleccionado de los microarreglos de tejido, les realizaron cortes a 4 micras, se colocó en portaobjetos electrocargados y se colocaron en la estufa por 30 minutos a 60 °C.
- b) Después de desparafinar, al último nivel se le realizó técnica de Hematoxilina y Eosina para reevaluar el material obtenido por los microarreglos y corroborar que tuvieran neoplasia, grado histológico y la suficiencia para evaluar el anticuerpo.
- c) Las laminillas desparafinadas se pasaron a xilol absoluto por 5 minutos. Se realizaron 10 lavados en el segundo baño de xilol, pasaron al segundo etanol absoluto, pasaron al primer etanol al 96%, pasaron al segundo etanol al 96% y finalmente pasaron a agua de recuperar la antigenicidad con citratos, en olla de recuperación por 10 minutos. Se atemperaron los vasos de Coplin y se colocan en el capilar y se lavaron con buffer por 2 minutos.

- d)** Se adicionó el anticuerpo monoclonal obtenido de ratón PTPN1 (PTP1B), clona OTI2G3 (antes 2G3) (TA503188), de la marca ORIGENE. Se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavó con buffer por 2 minutos. Se adicionó la solución de biotina. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se lavó con buffer por 2 minutos. Se adicionó la solución HRP, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se lavó con buffer por 2 minutos.
- e)** Se pasó a una canastilla, se colocaron 10 microlitros de solución de Diamino bencidina, al ver el color marrón al microscópico, se lavó. Se contrastó con Hematoxilina. Se enjuagó, realizando lavados con agua amoniacal. Se pasó al tren de deshidratación. Se cubrió con resina y cubreobjetos.
- f)** Se evaluó al microscopio y se descartaron los casos con material insuficiente.

La estandarización del anticuerpo se realizó en base a la siguiente metodología.

- a)** Se eligieron 3 tejidos de glándula mamaria normal y 3 áreas de tejido prostático normal, de 1 cm de largo, con espesor de 3mm. Estos tejidos fueron incluidos en parafina, se les realizaron cortes a 4 micras y se colocaron en laminillas electrocargadas.
- b)** Se realizó la técnica previamente descrita para IHQ. A cada corte se le colocó una dilución de 1:150, 1:100, 1:50 del anticuerpo.
- c)** Se evaluó al microscopio y se eligió la tinción que se consideró de mejor calidad para seleccionar la dilución.

- d)** Con cada “corrida” de IHQ para cada microarreglo se colocó un control externo (mama, próstata), positivo que se realizó en las mismas condiciones ambientales controladas en el equipo automatizado “autosteiner” de la marca DACO para igual condiciones de los casos (que incluyen control interno) y los controles externos, para evitar el error manual del operador.
- e)** Se evaluó al microscopio, y se validó el anticuerpo.

Para la evaluación del anticuerpo en muestras de cáncer de próstata se utilizó la siguiente técnica.

- a)** Se realizó la evaluación en un microscopio de luz Nikon Eclipse 80 de doble cabezal. La evaluación se realizó a 4x para corroborar de imagen “panorámica” la expresión del anticuerpo.
- b)** Se realizaron observaciones a 10x y 40 x en cada cilindro de microarreglo.
- c)** La escala a evaluar el anticuerpo se estableció por medio de un método cualitativo que fue reportado en número de cruces de la siguiente manera
- 0= Ausencia de tinción del anticuerpo en el tejido neoplásico
 - 1+= Tinción leve en citoplasma en el tejido neoplásico
 - 2+= Tinción moderada en citoplasma en tejido neoplásico
 - 3+= Tinción intensa en citoplasma en tejido neoplásico
 - NV= No valorable por inespecificidad en las células que expresan el anticuerpo, por tinción de fondo, falta de delimitación de la célula neoplásica, tinción en linfocitos, tinción en fibroblastos.

d) Después de la primera evaluación, se realizó una segunda evaluación de la tinción del anticuerpo con método semicuantitativo:

- NV= No valorable
- 0= Ausencia de tinción del anticuerpo en el tejido neoplásico
- 1+= 1 a 50% de células neoplásicas
- 2+= 51 a 75% de células neoplásicas
- 3+= 76 a 100% de células neoplásicas positivas.

e) La lectura fue realizada de manera cegada a las características clínicas por un patólogo experto en biología molecular.

f) La lectura automatizada con la aplicación DensitoQuant (clasificación de muestras teñidas con inmunohistoquímica) en el programa 3D HISTECH se realizará al completar la muestra del estudio.

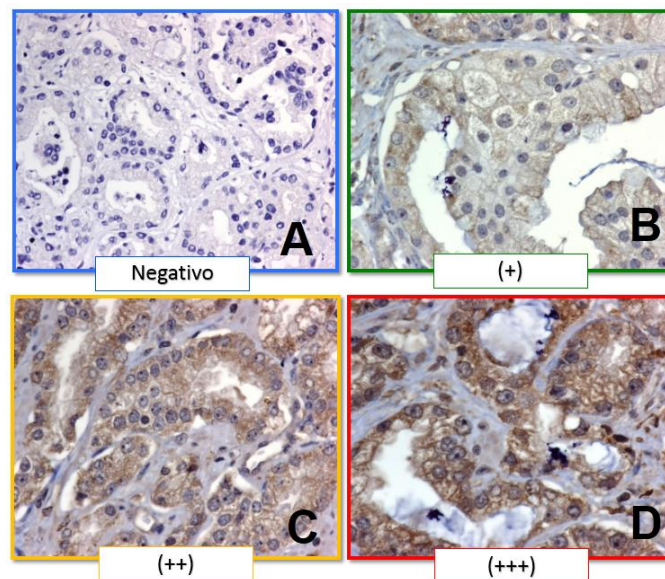


Imagen 7.0 Escala de tinción para inmunohistoquímica para PTP-1B. A) IHQ negativa. B) Leve intensidad (+). C) Moderada intensidad (++) . D) Alta intensidad (+++).

g) Finalmente se obtuvo una escala de intensidad de acuerdo al puntaje obtenido en el patrón primario y secundario. Como se ha descrito por el Trembaly et al. Como se puede ver en la **Tabla 1.0**.

Tabla 1.0 Intensidad de la tinción de PTP-1B y Puntaje Final		
Intensidad Primaria	Intensidad secundaria	Puntaje Final
0	N/A	0
0	1,2,3	1
1	N/A	2
1	2	3
1	3	4
2	1	5
2	N/A	6
2	3	7
3	2	8
3	N/A	9

8.5 Análisis estadístico

Objetivo principal

- a. Para el objetivo principal de estudio se realizará una comparación de dos grupos independientes mediante la prueba de *Wilcoxon Mann-Whitney*.
- b. Se estimará una p estadísticamente significativa ≤ 0.05 .
- c. Para estimar la necesidad de ajuste para la principal variable confusora diabetes, se realizará una comparación entre la escala de PTP1B entre pacientes diabéticos vs no diabéticos. En caso de encontrarse una

tendencia estadística para una diferencia se realizará un ajuste en un modelo multivariado.

- d. Se calculará la sensibilidad y especificidad de la escala de IHQ para PTP1B para clasificar a los pacientes como de buen o mal pronóstico mediante tablas de 2x2. Para seleccionar el punto de corte de la escala se construirá una curva ROC.

Objetivos secundarios

- a. Para el análisis de correlación entre la Escala de tinción de PTP-1B y los niveles de APE pre-quirúrgicos se utilizó una prueba de correlación de Pearson.
- b. Para el análisis de correlación entre la Escala de tinción de PTP-1B y escala de Gleason se utilizó una prueba de correlación de Pearson.
- c. Para el objetivo secundario de análisis de supervivencia global y libre de enfermedad de la escala de tinción de PTP-1B se utilizó el método de Kaplan Meier. Las gráficas de supervivencia se compararon con análisis de regresión de Cox.

8.6 Cálculo del tamaño de muestra

El tamaño de la muestra se calculó con base en la comparación de medias de dos grupos independientes previendo el uso de la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney. Estimando una distribución de los pacientes 70%/30% en factores no adversos/factores adversos y una media de la escala de 4 ± 2.0 vs 5 ± 2.5 , un alfa de 0.05 y un poder (1-b) de 0.8. La muestra total requerida es de 206 (n=145 buen pronóstico y n=61 factores adversos). Se utilizó para el cálculo el programa G

*Power 3.1.9.2 para el tamaño de muestra. En la **Tabla 2.0** se puede ver el cálculo realizado.

Tabla 2.0 Cálculo del tamaño de la muestra	
Datos ingresados	
Colas	2 colas
Tipo de distribución	Normal
Probabilidad de error alfa	0.05
Poder ($1 - \beta$)	0.80
N2/N1	0.42
Resultados	
Tamaño grupo 1	145
Tamaño grupo 2	61
Tamaño total de muestra	206
Poder	0.80

9. RESULTADOS

9.1 Casos identificados

En el período de tiempo de 1990 a 2015, se encontraron un total de 1513 pacientes con el diagnóstico de cáncer de próstata. Dentro de los cuáles se encontró a 502 prostatectomías. Se ha realizado la revisión del expediente 352 pacientes (n=164 pacientes sin factores patológicos adversos y n=188 pacientes con factores patológicos adversos).

La revisión de patología se ha llevado a cabo en n=115 pacientes SIN factores patológicos adversos. Ochenta y seis casos fueron eliminados por insuficiente material de patología para hacer el análisis y 29 muestras completaron la valoración de patología. Un total de 75 muestras CON factores patológicos adversos fueron revisadas por patología, de éstas se eliminaron 32 por insuficiente

material para el análisis, se examinó la lectura de PTP-1B para 44. En la **Figura 1.0** se muestra el Diagrama de flujo de la obtención de casos y el análisis de muestras. Hasta el momento se cuenta con una N=73 con lectura completa de los factores patológicos adversos y de la lectura del grado de expresión de PTP-1B obtenidos durante el período de tiempo del 1990 a 2015.

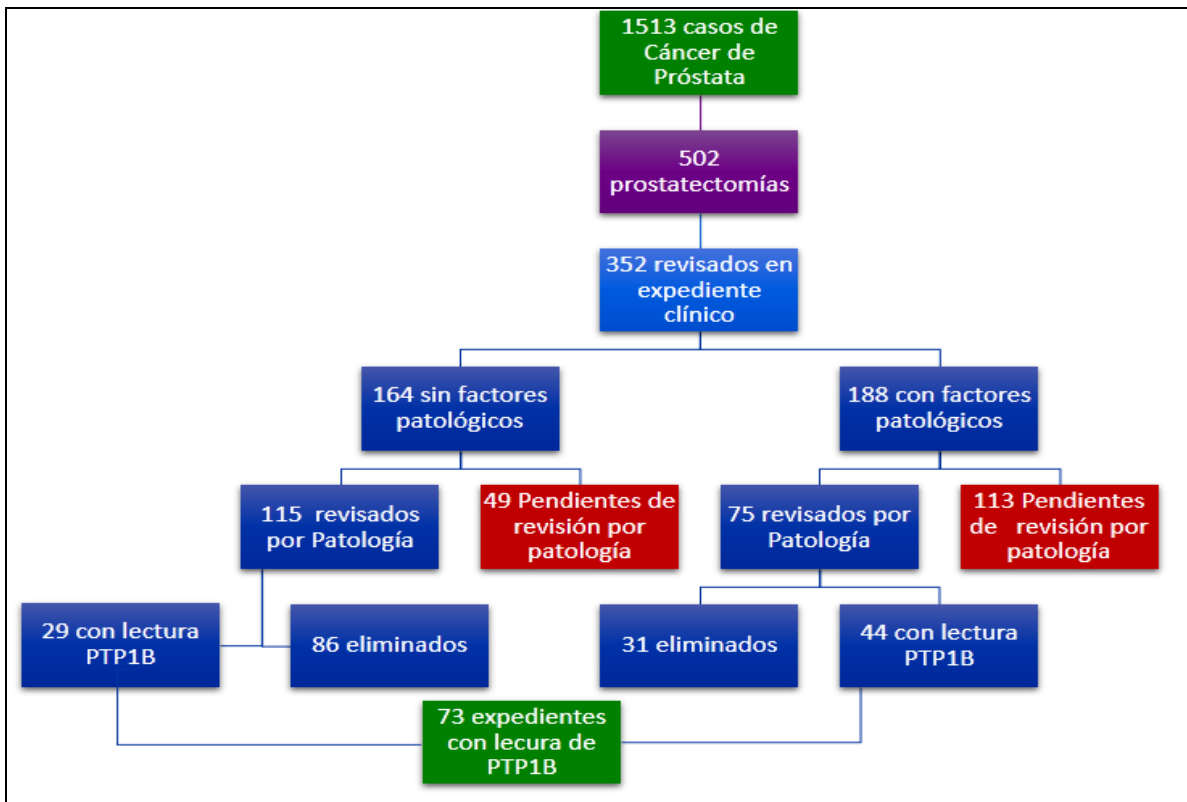


Figura 1.0 Evaluación de casos con cáncer de próstata evaluados para ingreso al estudio.

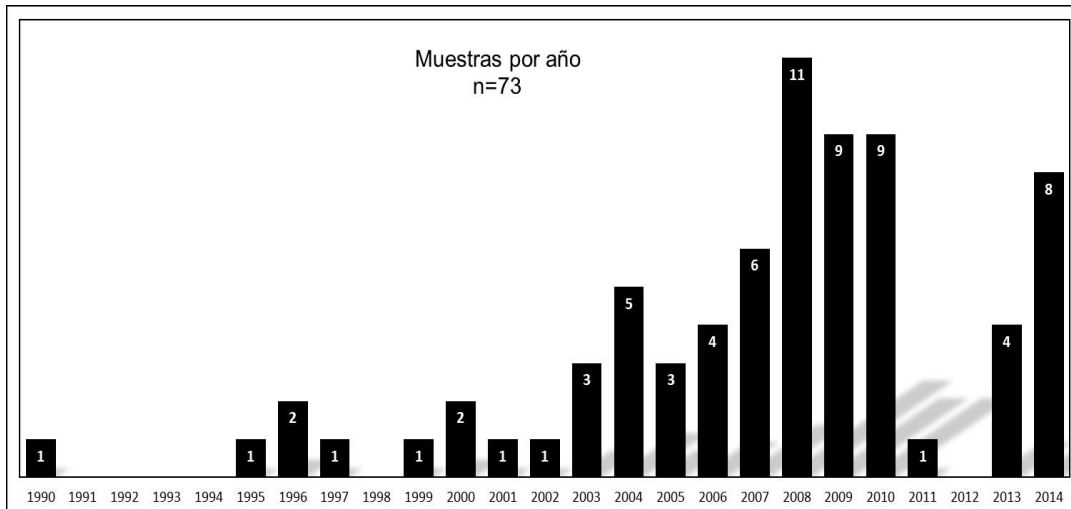


Figura 2.0 Gráfica que denota el año de las muestras obtenida de acuerdo a la fecha de la prostatectomía radical.

9.2 Características de los pacientes

De los 73 pacientes analizados, la mediana de edad fue de 62 años \pm 6.9 años, con un mínimo de edad de 44 años y un máximo de 78 años. La mediana de IMC fue de 27.2 kg/m², se encontró con sobrepeso u obesidad a 68.85%. De la muestra 20.3% presentó DM2 previo al diagnóstico de cáncer de próstata, se registró a 21.91% con uso de metformina (la indicación fue DM2 o síndrome metabólico), el uso de otros anti-diabéticos o insulina se registró el 10.95% y 1.36%. Las variables están registradas en la **Tabla 3.0**.

Tabla 3.0 Características Demográficas		n=73
Características		
Edad - años (rango).		62 ± 6.9 (44-78)
40-49 años -no. (%)		3 (4.1%)
50-59 años		20 (27.39%)
60-69 años		41 (56.16%)
70 años o más		9 (12.32 %)
IMC - kg/m² (rango)		27.2 ± 3.2 (19-32)
Normal-no. (%)		22 (30.13%)
Sobrepeso		33 (44.2%)
Obesidad leve		18 (24.65%)
Uso de medicamentos previo a Prostatectomía no. (%)		
Inhibidores de 5 a reductasa		3 (4.1%)
Bloqueadores a 1		20 (27.39%)
Diabetes Mellitus tipo 2 no. (%)		
Previa al diagnóstico		15 (20.3%)
Uso de metformina		16 (21.91%)
Otros antidiabéticos		8 (10.95%)
Insulina		1 (1.36%)

En cuanto a las características clínicas, en la **Tabla 4.0** podemos observar que se encontró que 38.4 % de los pacientes fueron detectados mediante tamizaje. En cuanto a la biopsia al diagnóstico, la suma de Gleason más encontrada fue de 6 en 39 casos (53.42%). Con respecto a la distribución de la población acuerdo la clasificación D'Amico (clasificación de riesgo bajo, moderado y alto riesgo) para la presencia de enfermedad no órgano confinada o avanzada.

Tabla 4.0 Características de la Enfermedad (n=73)	
Tamizaje	
	no. (%)
Sí	28 (38.4%)
No	45 (61.6%)
Gleason Total de la Biopsia	
	no. (%)
6	39 (53.42%)
7	21 (28.76%)
8	7 (9.58%)
9	5 (6.48%)
APE ng/mL Mediana (rango)	
	13.7 (2-84)
Riesgo D´Amico	
	no. (%)
Bajo	24 (32.87%)
Intermedio	25 (34.24%)
Alto	24 (32.87%)
Etapa clínica pre-prostatectomía	
	no. (%)
I	21 (28.76%)
IIA	28 (38.35%)
IIIB	23 (31.5 %)
III	1 (1.36 %)
IV	0

En la **Tabla 5.0** se muestran los resultados de la revisión de las características patológicas realizada de forma cegada a las características clínicas por un patólogo experto. El tamaño tumoral graduado en % mostró que la mayoría de los pacientes tienen un porcentaje tumoral menor al 50%. El 24.65% de los pacientes tuvo un puntaje de Gleason de 6, 40.31% un valor de 7 y el resto fue un Gleason \geq a 8. Con respecto a la presencia de factores patológicos adversos (definición del constructo se consideró como positivo la presencia de cualquiera de los siguientes: extensión extraprostática, invasión a vesículas seminales y márgenes quirúrgicos positivos), 44 casos (60.27%) los presentaron. Adicionalmente, 5 casos (6.84%) se encontró con enfermedad ganglionar positiva.

Tabla 5.0 Análisis del producto de prostatectomía (n=73)	
Tamaño tumoral	n (%)
0 a 25%	31 (42.46%)
26 a 50%	29 (39.72%)
51 a 65%	11 (15.06%)
66 a 100%	2 (2.73%)
Gleason total	n (%)
6	18 (24.65%)
7	36 (49.31%)
8	8 (10.95%)
9	11 (15.06%)
Factores patológicos adversos	n (%)
EEP	19 (26.02%)
IVS	19 (26.02%)
Margen no apical	43 (58.90%)
Constructo	44 (60.27%)
Ganglios con metástasis n (%)	5 (6.84%)
Etapa clínica	
I	6 (8.21%)
IIA	13 (17.8%)
IIB	30 (41.09%)
III	19 (26.07%)
IV	5 (6.84%)

Una vez analizadas las características de la pieza quirúrgica, se procedió a realizar los microarreglos de tejido y la lectura de la inmuno-tinción de PTP-1B. La distribución del score obtenido se muestra en la **Tabla 6.0**.

Tabla 6.0 Score de Expresión de PTP-1B- no. (%) n=73	
Score de Expresión de PTP-1B	no. (%)
0	1 (1.36%)
1	1 (1.36%)
2	10 (13.69%)
3	6 (8.21%)
4	1 (1.36%)
5	10 (13.69%)
6	10 (13.69%)
7	0
8	9 (12.32%)
9	25 (34.24%)

9.3 Expresión de PTP-1B en pacientes CON y SIN factores patológicos adversos

Para demostrar el objetivo primario se realizó una prueba de Wilcoxon Mann-Whitney. La mediana [IQR] en el grupo SIN factores patológicos fue de 5.00 [3.00 – 8.00] con una media de 5.3 ± 2.6 . El grupo con FPA con una mediana 8.00 [5.00-9.00] con una media 6.7 ± 2.7 . Con una diferencia estadísticamente significativa con una $p=0.026$. En la **Figura 3.0** Valores del Score de PTP-1B en pacientes CON y SIN factores patológicos adversos se puede observar el gráfico correspondiente a este análisis.

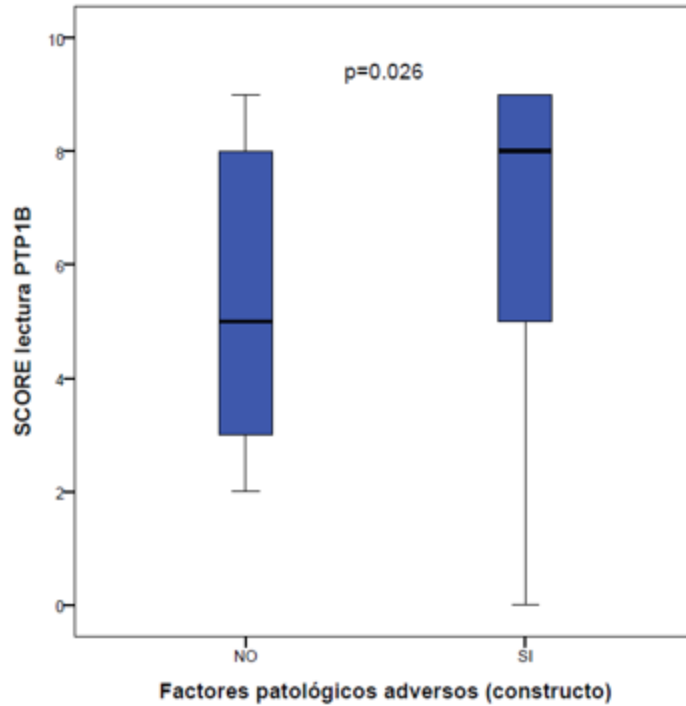


Figura 3.0 Diferencias en el grado de expresión de PTP-1B en pacientes CON y SIN factores patológicos adversos.

9.4 Análisis de Correlación

Se realizó una Prueba de correlación de Spearman entre el Score de PTP-1B y el puntaje en la escala de Gleason de los pacientes, mostró una $r=0.24$ ($p=0.042$). La correlación con los niveles de APE pre quirúrgicos mostraron $r= 0.243$ con un valor de $p= 0.046$.

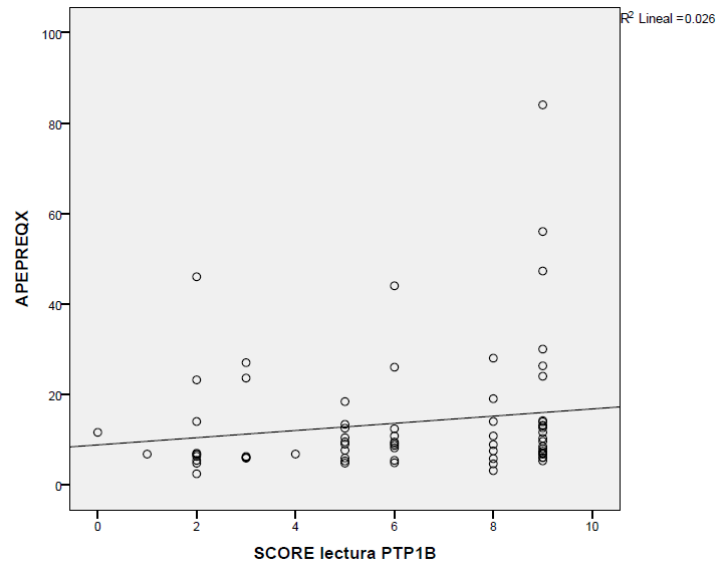


Figura 4.0 Correlación entre los valores del grado de expresión de PTP-1B y de los valores de APE pre-quirúrgicos

9.5 Análisis de regresión logística

Se hizo un análisis de regresión logística con dos modelos. Uno para identificar la independencia de variables biológicamente asociadas (metormina y DM2 y otro para evaluar la independencia de factores de riesgo conocidos (Gleason y APE).

- 1) Para evaluar la independencia de las variables confusoras de DM2 y uso de metformina se realizó un análisis de regresión logística, incluyendo dichas variables. El grado de expresión de PTP-1 permaneció como significativo en el modelo independientemente del diagnóstico de DM2 y el uso de metformina.

	OR	IC 95%	p
Score PTP-1B	1.21	1.01-1.45	0.037
Metformina	1.49	0.10-21.77	0.768
DM2	0.68	0.45-10.04	0.776

2) Para evaluar el comportamiento del score de PTP-1B en presencia de los otros factores predictores conocidos (APE y Gleason) se realizó un segundo análisis de regresión logística. Con una $p=0.004$ para el modelo.

	OR	IC 95%	p
Score PTP-1B	1.68	0.97-1.41	0.11
Gleason	1.53	0.83-2.85	0.18
APE	1.07	0.99-1.15	0.08

Se calculó el “Estadístico C”, construyendo curvas ROC para la las siguientes categorías. En la **Figura 5.0** se puede ver el área bajo la curva (AUC) para las siguientes categorías:

- AUC score de PTP-1B \rightarrow 0.651 (0.522 - .780) $p = 0.030$
- AUC APE + Gleason \rightarrow 0.707 (0.586-0.828) $p= 0.03$
- AUC Score + APE + Gleason \rightarrow 0.73 (0.619-0.846) $p= 0.001$

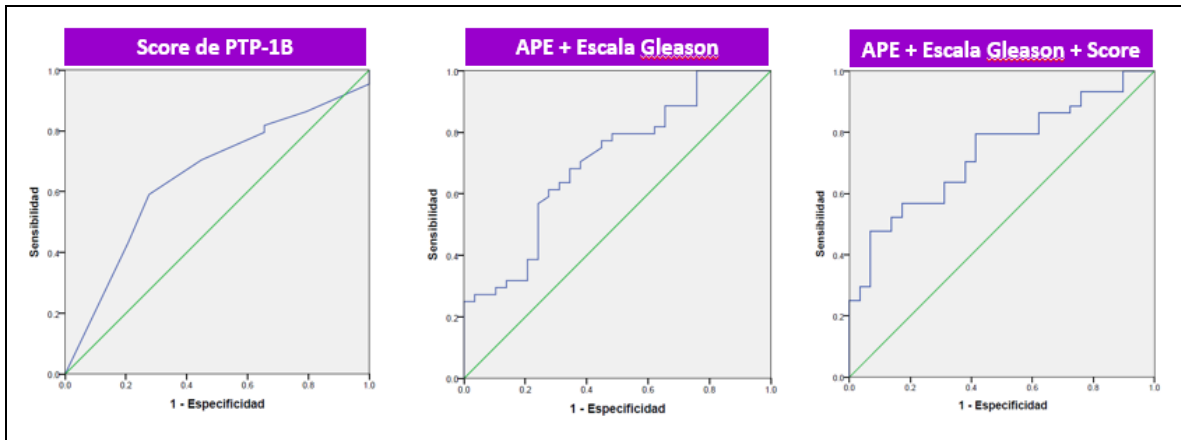


Figura 5.0 Áreas bajo la curva para la presencia de factores patológicos adversos para: a) Score de PTP-1B, b) APE + Escala de Gleason, y c) APE + Escala de Gleason + Score de PTP-1B

9.6 Análisis de supervivencia

Se realizó un análisis de supervivencia por curvas de Kaplan-Meier. Se estimó la supervivencia global y supervivencia cáncer específica (**Figura 6.0**). Para determinar el punto de corte para la variable dicotómica PTP-1B, se realizó un análisis de sensibilidad y especificidad para los distintos grados de expresión de la fosfatasa y se estableció el punto de corte en 5.

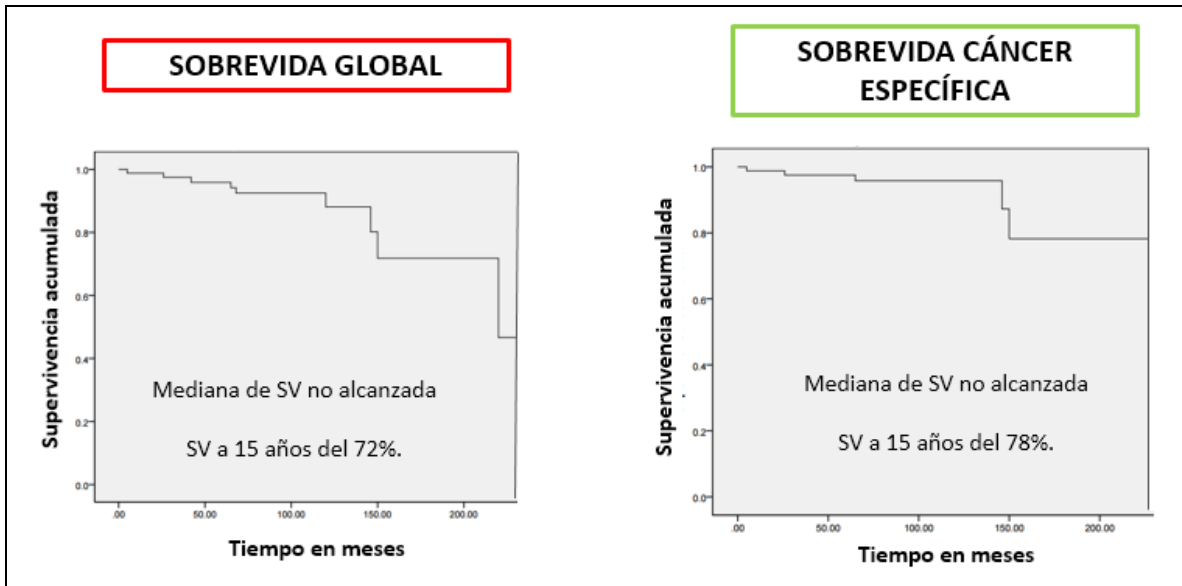


Figura 6.0 Curva de supervivencia global y cáncer específica de los pacientes incluidos.

PTP-1B	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
0.00	1.000	1.000
0.50	0.977	1.000
1.50	0.955	1.000
2.50	0.864	0.793
3.50	0.818	0.655
4.50	0.795	0.655
5.50	0.705	0.448
7.00	0.591	0.276
8.50	0.432	0.207
10.00	0.000	0.000

Figura 7.0 Curva ROC para la presencia de sensibilidad y especificidad para la presencia de factores patológicos adversos.

Se hizo un Análisis de Regresión de Cox para supervivencia global de acuerdo a la expresión dicotómica de PTP-1B (grupo con puntaje ≤ 5 y grupo con puntaje ≥ 6). Con una Hazard Ratio (HR) de muerte de 3.156 (IC 95% 0.365-26.79), $p=0.157$. Y para supervivencia cáncer específica con un HR de muerte para el grupo con puntaje alto de 3.29 (IC 95% 0.365 a 29.736) con una $p=0.288$.

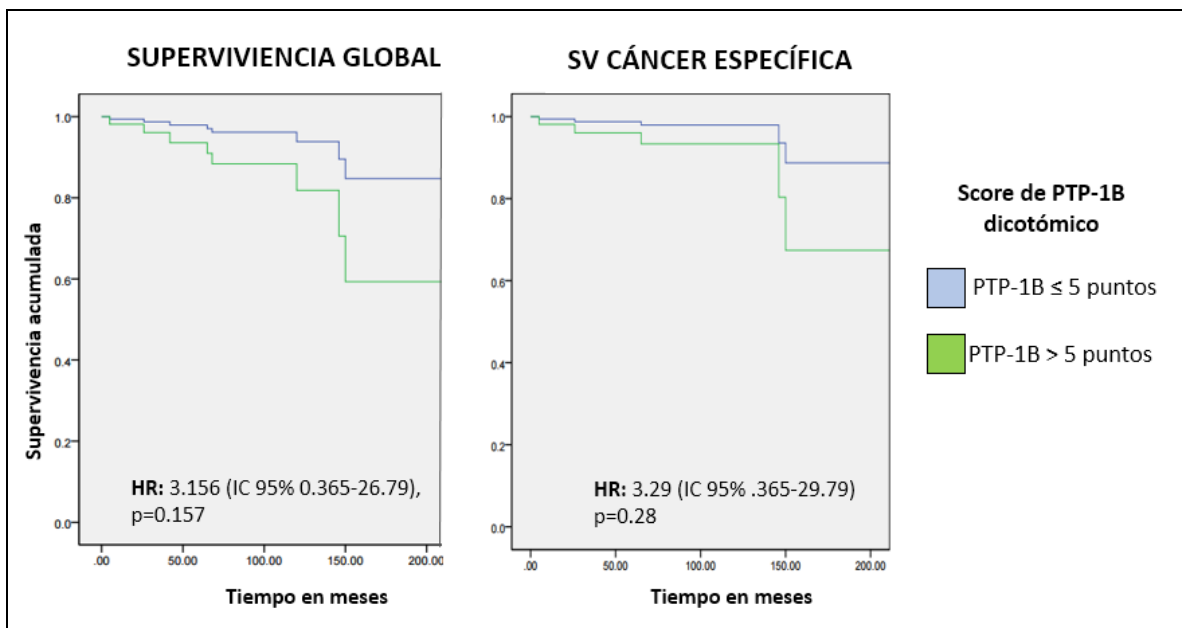


Figura 8.0 Análisis de supervivencia global y cáncer específica por regresión de Cox de acuerdo al puntaje de PTP-B

10. DISCUSIÓN

La cuantificación de la expresión de PTP-1B se realizó por el método de inmunohisquímica y con la lectura de un patólogo experto cegado a las características clínicas. Esta es una medición de bajo costo y que está al alcance de la mayoría de los centro de patología. En el presente estudio se cumplió con la

hipótesis planteada de que el grado de expresión está incrementado en pacientes CON factores patológicos adversos con respecto al grupo SIN factores patológicos adversos con respecto en el grupo CON factores patológicos (5 [3 - 8] vs 8 [5 - 9], $p=0.026$).

Es importante recordar, que PTP-1B se encuentra vinculado a varias vías de señalización, entre ellas regula la actividad del receptor de insulina y la vía de la leptina. Es de interés particular que en el modelo de regresión logística la asociación entre la expresión de PTP-1B y la presencia de factores patológicos adversos se mantiene independientemente de la presencia de DM2 y del uso de metformina (OR 1.21, IC 95% 1.01- 1.45, $p=0.037$).

Cabe resaltar que en el análisis de regresión logística en el que se incluyeron, el score de expresión de PTP-1B, los niveles de APE y la escala de Gleason se encontró como significativo al modelo ($p=0.004$). No obstante, al evaluar la independencia de los factores de riesgo ya conocidos, los tres pierden significancia estadística. Esto puede ser debido a colinealidad entre los tres factores evaluados.

Si bien, la manera más accesible y fácil de medir el grado de expresión es con inmunohistoquímica, puede existir falsos positivos por reacciones cruzadas. Existen otros grupos que han medido la expresión mediante Western blot o PCR, mismas técnicas que podría ser utilizadas en el material de estudio (37, 38). No obstante, la disponibilidad de estas herramientas en la práctica clínica es limitada además de costosa.

Si logra validarse en otras cohortes, la utilidad clínica del incremento en la expresión de esta fosfatasa en pacientes CON factores patológicos adversos, radica en que podría brindar al clínico más elementos para orientar al paciente en la toma de decisiones con respecto al tratamiento primario (prostatectomía vs radioterapia/hormonoterapia). Si bien la prostatectomía es efectiva como única modalidad de tratamiento en pacientes SIN factores patológicos adversos; en pacientes CON factores patológicos adversos esta terapéutica debe complementarse con la administración de radioterapia que implica un incremento en la toxicidad genitourinaria. O bien se puede dar como tratamiento primario radioterapia más hormonoterapia sin intervención quirúrgica.

Una de las preocupaciones clínicas de los pacientes CON factores patológicos adversos es su mayor riesgo de recurrencia o de muerte asociada a cáncer de próstata y con el objetivo de mejorar su pronóstico se ofrece la radioterapia adyuvante. No obstante, al ser un tratamiento que incrementa la toxicidad genitourinaria se ha propuesto que los pacientes reciban radioterapia de salvamento, es decir, en el momento en que se comienza a elevar en APE nuevamente. En este caso, PTP-1B podría ser una herramienta adicional en la toma de decisiones en este escenario.

El grado de expresión de PTP-1B fue medido en este estudio por inmunohistoquímica. No obstante, esta medición no refleja la funcionalidad de la proteína. La proteína en su forma inactiva se encuentra ligada al retículo endoplásmico rugoso cerca del núcleo, mientras que en su forma activa se

encuentra al nivel del citoplasma cercano a la membrana donde interacciona con diferentes vías como la del receptor de insulina, el sustrato I del receptor de insulina, *JAK-2* (Janus kinase-2) y la proteína oncogénica *Src*. Por medio de la medición cuantitativa automatizada con un software se podría hacer la cuantificación de la expresión. (39)

Cada vez más se conoce que los fenómenos intracelulares en cáncer están mediados por varias vías de señalización entrelazada y en un proceso dinámico. El poder fortalecer la observación positiva de este estudio con respecto a PTP-1B con la medición de otros marcadores implicados en migración, invasión y proliferación celular, podría llevarnos a construir un panel de inmunotinción que funcione como predictor de la presencia de factores patológicos adversos. Esto se podría construir en el MAT que tenemos disponible.

Dentro de los potenciales marcadores candidatos a incluir se encuentran, la pérdida de PTEN, RB1, NKX3, TP53, TMRSS2, ATM, la expresión de MYC, enolasa, DLX2, ki-67, del receptor de estrógenos. La pérdida de PTEN, aumento en la expresión de Ki 67, y la sobre-expresión del oncogen *myc* en muestras de prostatectomía de alto riesgo, se asociaron a pobre supervivencia libre de progresión (33, 40-45). Dentro de las perspectivas futuras de estudio se planea construir un panel y analizar su asociación con factores patológicos adversos.

Con respecto al análisis de supervivencia, cabe aclarar que fue un análisis secundario y que el estudio no tiene poder para demostrar esta diferencia. El cáncer de próstata es una neoplasia indolente de bajo potencial de mortalidad

cuando se compara con otras. Incluso cuando se comparan tratamiento locales radicales, la diferencia se espera encontrar más allá de los 10 años de sobrevida. Adicionalmente, los tratamientos adicionales recibidos en los pacientes a la recurrencia no fueron controlados. En las curvas se denota un incremento en el riesgo de muerte en los pacientes que tienen mayor expresión de la fosfatasa, no obstante sin diferencia estadísticamente significativa.

11. CONCLUSIONES

Los pacientes que tienen factores patológicos adversos tienen mayor expresión de la fosfatasa PTP-1B. Este incremento es independiente de la presencia de DM2 o uso de metformina previo en los pacientes.

La expresión de PTP-1B en tejido no es un biomarcador útil de forma adicional a los ya conocidos (niveles de APE y escala de Gleason) para predecir la presencia de factores patológicos adversos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*;66(1):7-30.
2. Thompson I, Thrasher JB, Aus G, Burnett AL, Canby-Hagino ED, Cookson MS, et al. Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update. *J Urol*2007 Jun;177(6):2106-31.
3. Dall'Era MA, Albertsen PC, Bangma C, Carroll PR, Carter HB, Cooperberg MR, et al. Active surveillance for prostate cancer: a systematic review of the literature. *Eur Urol* Dec;62(6):976-83.
4. Thompson IM, Jr., Tangen CM, Paradelo J, Lucia MS, Miller G, Troyer D, et al. Adjuvant radiotherapy for pathologically advanced prostate cancer: a randomized clinical trial. *JAMA*2006 Nov 15;296(19):2329-35.
5. Morgan SC, Waldron TS, Eapen L, Mayhew LA, Winkquist E, Lukka H. Adjuvant radiotherapy following radical prostatectomy for pathologic T3 or margin-positive prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Radiother Oncol*2008 Jul;88(1):1-9.
6. Wiegel T, Bartkowiak D, Bottke D, Bronner C, Steiner U, Siegmann A, et al. Adjuvant radiotherapy versus wait-and-see after radical prostatectomy: 10-year follow-up of the ARO 96-02/AUO AP 09/95 trial. *Eur Urol* Aug;66(2):243-50.
7. Jiang ZX, Zhang ZY. Targeting PTPs with small molecule inhibitors in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev*2008 Jun;27(2):263-72.
8. Hunter T. The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*1998 Apr 29;353(1368):583-605.
9. Zhang ZY. Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*2001 Aug;5(4):416-23.
10. Ventura JJ, Nebreda AR. Protein kinases and phosphatases as therapeutic targets in cancer. *Clin Transl Oncol*2006 Mar;8(3):153-60.
11. Park JW, Neve RM, Szollosi J, Benz CC. Unraveling the biologic and clinical complexities of HER2. *Clin Breast Cancer*2008 Oct;8(5):392-401.
12. Karlsson L, Bondjers C, Betsholtz C. Roles for PDGF-A and sonic hedgehog in development of mesenchymal components of the hair follicle. *Development*1999 Jun;126(12):2611-21.
13. Heldin CH, Eriksson U, Ostman A. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Arch Biochem Biophys*2002 Feb 15;398(2):284-90.
14. Coltrera MD, Wang J, Porter PL, Gown AM. Expression of platelet-derived growth factor B-chain and the platelet-derived growth factor receptor beta subunit in human breast tissue and breast carcinoma. *Cancer Res*1995 Jun 15;55(12):2703-8.
15. Seymour L, Dajee D, Bezwoda WR. Tissue platelet derived-growth factor (PDGF) predicts for shortened survival and treatment failure in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*1993;26(3):247-52.

16. Guedes LB, Tosoian JJ, Hicks J, Ross AE, Lotan TL. PTEN Loss in Gleason Score 3+4=7 Prostate Biopsies is Associated with Non-Organ Confined Disease at Radical Prostatectomy. *J Urol* Sep 27.
17. Paulsson J, Sjöblom T, Micke P, Pontén F, Landberg Gr, Heldin C-H, et al. Prognostic Significance of Stromal Platelet-Derived Growth Factor α 2-Receptor Expression in Human Breast Cancer. *The American Journal of Pathology* 2009;175(1):334-41.
18. Woodford-Thomas TA, Rhodes JD, Dixon JE. Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 1992 Apr;117(2):401-14.
19. Bourdeau A, Dube N, Tremblay ML. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Curr Opin Cell Biol* 2005 Apr;17(2):203-9.
20. Klamann LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2000 Aug;20(15):5479-89.
21. Liu F, Chernoff J. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor. *Biochem J* 1997 Oct 1;327 (Pt 1):139-45.
22. Bjorge JD, Pang A, Fujita DJ. Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. *J Biol Chem* 2000 Dec 29;275(52):41439-46.
23. Anderie I, Schulz I, Schmid A. Direct interaction between ER membrane-bound PTP1B and its plasma membrane-anchored targets. *Cellular Signalling* 2007;19(3):582-92.
24. Radke I, Gotte M, Kersting C, Mattsson B, Kiesel L, Wulfing P. Expression and prognostic impact of the protein tyrosine phosphatases PRL-1, PRL-2, and PRL-3 in breast cancer. *Br J Cancer* 2006 Aug 7;95(3):347-54.
25. López-Zelada KA, Garibay-Dañaz JCs, Escobar-Arriaga E, León-Rodríguez E, de la Peña-López R, Esparza-López J, et al. El silenciamiento de PTP1B disminuye la proliferación celular en cultivos primarios de cáncer de mama. *Gaceta Mexicana de Oncología*;13(3):144-51.
26. Soysal S, Obermann EC, Gao F, Oertli D, Gillanders WE, Viehl CT, et al. PTP1B expression is an independent positive prognostic factor in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* Jan;137(2):637-44.
27. Wang N, She J, Liu W, Shi J, Yang Q, Shi B, et al. Frequent amplification of PTP1B is associated with poor survival of gastric cancer patients. *Cell Cycle*;14(5):732-43.
28. Hoekstra E, Das AM, Swets M, Cao W, van der Woude CJ, Bruno MJ, et al. Increased PTP1B expression and phosphatase activity in colorectal cancer results in a more invasive phenotype and worse patient outcome. *Oncotarget* Apr 19;7(16):21922-38.
29. Liu H, Wu Y, Zhu S, Liang W, Wang Z, Wang Y, et al. PTP1B promotes cell proliferation and metastasis through activating src and ERK1/2 in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* Apr 10;359(2):218-25.
30. Julien SG, Dube N, Hardy S, Tremblay ML. Inside the human cancer tyrosine phosphatome. *Nat Rev Cancer* Jan;11(1):35-49.

31. Lessard L, Labbe DP, Deblois G, Begin LR, Hardy S, Mes-Masson AM, et al. PTP1B is an androgen receptor-regulated phosphatase that promotes the progression of prostate cancer. *Cancer Res* Mar 15;72(6):1529-37.
32. Wu C, Zhang L, Bourne PA, Reeder JE, di Sant'Agnese PA, Yao JL, et al. Protein tyrosine phosphatase PTP1B is involved in neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *Prostate* 2006 Aug 1;66(11):1125-35.
33. Antonarakis ES, Keizman D, Zhang Z, Gurel B, Lotan TL, Hicks JL, et al. An immunohistochemical signature comprising PTEN, MYC, and Ki67 predicts progression in prostate cancer patients receiving adjuvant docetaxel after prostatectomy. *Cancer* Dec 15;118(24):6063-71.
34. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Annals of Surgical Oncology*. [journal article].17(6):1471-4.
35. Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005 Sep;29(9):1228-42.
36. Comperat E, Camparo P, Srigley J, Delahunt B, Egevad L. [International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on handling and staging of radical prostatectomy specimens]. *Ann Pathol* Jun;33(3):155-61.
37. Wang N, She J, Liu W, Shi J, Yang Q, Shi B, et al. Frequent amplification of PTP1B is associated with poor survival of gastric cancer patients. *Cell Cycle*;14(5):732-43.
38. Gao L, Zhang X, Wang F-r, Cao M-f, Zhang X-j, Sun N-n, et al. Chronic ethanol consumption up-regulates protein-tyrosine phosphatase-1B (PTP1B) expression in rat skeletal muscle. *Acta Pharmacologica Sinica*;31(12):1576-82.
39. Muñoz-Hernández S, Huerta-Yeppez S, Hernández-Pedro N, Ramírez-Tirado L-A, Aviles-Salas A, Maldonado A, et al. Association between nuclear expression of retinoic acid receptor alpha and beta and clinicopathological features and prognosis of advanced non-small cell lung cancer. *International Journal of Clinical Oncology*:1-11.
40. Grindstad T, Skjefstad K, Andersen S, Ness N, Nordby Y, Al-Saad S, et al. Estrogen receptors $\hat{1}$ and $\hat{2}$ and aromatase as independent predictors for prostate cancer outcome. *Scientific Reports*;6:33114.
41. Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, Drier Y, Cibulskis K, Sivachenko AY, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature*;470(7333):214-20.
42. Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, Demichelis F, Blattner M, Theurillat J-P, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet*;44(6):685-9.
43. Abate-Shen C, Shen MM, Gelmann E. Integrating differentiation and cancer: the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Differentiation* 2008 Jul;76(6):717-27.
44. Bova GS, Carter BS, Bussemakers MJ, Emi M, Fujiwara Y, Kyprianou N, et al. Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res* 1993 Sep 1;53(17):3869-73.

45. Green WJ, Ball G, Hulman G, Johnson C, Van Schalwyk G, Ratan HL, et al. KI67 and DLX2 predict increased risk of metastasis formation in prostate cancer-a targeted molecular approach. *Br J Cancer* Jul 12;115(2):236-42.