



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Facultad de Medicina

Hospital Juárez de México

“Análisis de la proteína PTOV1 como posible marcador tumoral en pacientes con
cáncer de próstata en población mexicana. Estudio piloto”

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el título de

Cirujano Urólogo

Presenta

Dr. Edgar Fabián Bartolo Rangel

Director de tesis:

Acad. Dr. Carlos Viveros Contreras

Asesor de tesis:

M. en C. Mónica Sierra Martínez.

2014



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.

HOJA DE AUTORIZACIÓN

ACAD. DR. CARLOS VIVEROS CONTRERAS

JEFE DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA
PROF. TITULAR. DEL CURSO DE UROLOGÍA
DIRECTOR DE TESIS

M. en C. MONICA SIERRA MARTÍNEZ

ASESOR DE TESIS

Dedicatoria y agradecimientos.

A mis padres por hacerme creer que se puede llegar hasta donde uno lo desea y más; por ser mi inspiración, aquello que me impulsa a seguir siempre adelante.

Mar, Edgar por estar siempre conmigo, ser testigos del esfuerzo y por entender mis ausencias, todo trabajo trae consigo recompensa. Por ser mis socios en cada nueva aventura que se pueda emprender Y Ernesto, por tu llegada con nosotros.

Hermanos por ser las únicas personas que están siempre apoyándome, por esa disponibilidad a sacarme del apuro, por esa confianza que tengo hacia ustedes, por no dejarme nunca caer.

Suegros agradezco infinitamente su apoyo.

A todos mis maestros.

Especial agradecimiento a Dr Stanlin García con quien inicie esta aventura, por las peripecias para poder introducir a México el anticuerpo. A Minerva Mata por los cortes y el procesamiento del tejido.

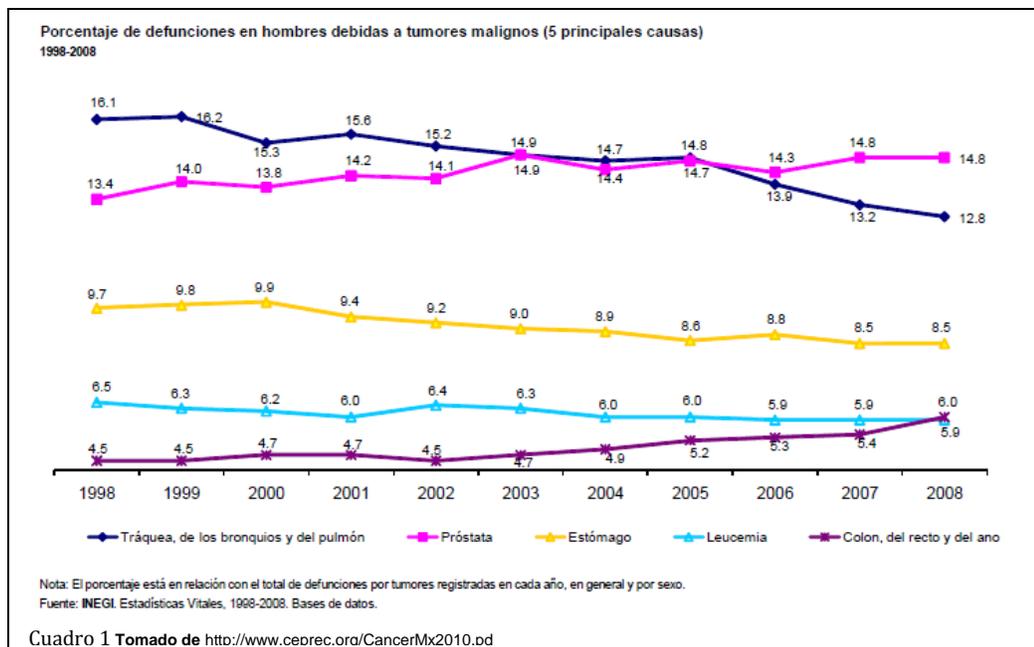
Índice

Antecedentes	1
Marco teórico	2
Planteamiento del problema	6
Justificación	6
Hipótesis	6
Objetivos	6
Objetivo General	6
Objetivos específicos	7
Diseño del estudio	7
Criterios de inclusión	7
Criterios de exclusión	7
Materiales y métodos	7
Tamaño de la muestra	7
Procesamiento del tejido	8
Reactivos	9
Métodos estadísticos	9
Consideraciones éticas	9
Cronograma	10
Resultados y discusión	11
Conclusión	20
Anexos	21
Anexo 1 Fotografías	21
Anexo 2 Tablas del promedio densidad óptica integrada por paciente	24
Bibliografía	26

Antecedentes:

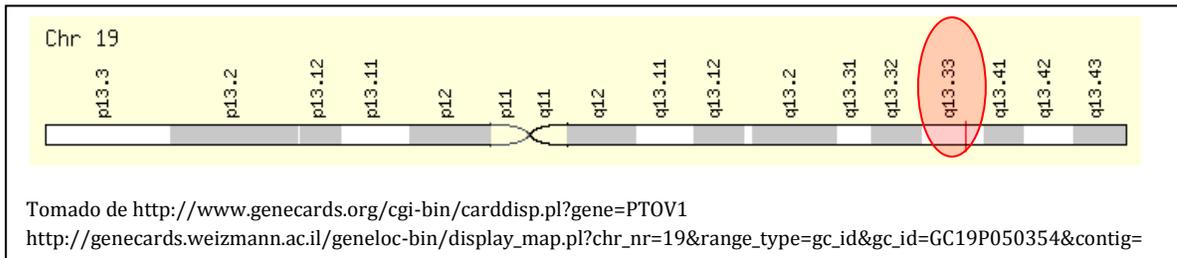
Mundialmente, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad. Este flagelo es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) que produce la degeneración de las células, con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos¹. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues estima que pasara de 7.9 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; además, estima que durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones.² De 1998 a 2008, la tasa de mortalidad por cáncer se incrementó, pasando de 57.7 a 66.6 por cada 100 mil habitantes,¹ lo que representa un aumento de 12.4% a 13.4% defunciones por tumores malignos.³

Resulta preocupante que la población masculina presente la tasa de defunciones por tumores más alta, por la elevada mortalidad por tumor de próstata (121.57 por cada 100 mil hombres). Particularmente en personas de 60 años o más¹. De acuerdo con las defunciones por tumores malignos en 2008, entre los hombres, el mayor porcentaje de lesiones malignas fue en la próstata (8.1%), seguido por los tumores de tráquea, bronquios y pulmón (7.0%), enfermedad asociada al consumo de tabaco^{1,3}. Las muertes por lesiones malignas de próstata, en el periodo (diez años) tiene un ligero incremento de 1.4 puntos porcentuales; por lo cual, desde 2003 se inicia un aumento que la acerca a ser la primera causa de muerte en varones, hasta 2006 en que ocupa el primer lugar³. **Cuadro 1**



No existe en la actualidad ningún estudio que nos diga de manera inequívoca que un paciente tiene cáncer de próstata o no, para esto echamos mano de algunos estudios paraclínicos que nos ayuden en la caza de esta patología, de los más importantes están el APE, el PCA3 y en la actualidad una proteína y su gen: el PTOV1.

Es en el año 2001 cuando se publica la primera descripción de la proteína sobreexpresada de cáncer de próstata y su gen por Benedit et.al. En ésta, PTOV1 fue identificada como un nuevo gen y su proteína en un estudio que buscaba detectar marcadores moleculares de progresión en cáncer de próstata, describe que es codificada por 12 exones localizados en el cromosoma 19q13.3⁴.



Marco Teórico.

La proteína PTOV1 se compone de dos cadenas homólogas de 151 y 147 aminoácidos, unidas por un péptido enlazador corto. Además se describió otro gen denominado PTOV2 que consta de un solo bloque. Reportan que en el tejido prostático normal y en el crecimiento prostático, PTOV1 fue indetectable o se expresaba en niveles bajos, mientras que 9 de cada 11 adenocarcinomas de próstata mostraron una fuerte inmunoreactividad, con una distribución focal en áreas de carcinoma y neoplasia intraepitelial prostática, los niveles fueron más altos en el tejido de adenocarcinoma y en su tejido sano periférico, no así, en el tejido prostático benigno⁴.

PTOV1 se marcó con proteína verde fluorescente (GFP) de esta manera se determinó que interactúa a nivel nuclear y al ingresar induce la proliferación al forzar a la célula a entrar a la fase S del ciclo celular con lo que se estimula la replicación del DNA. De hecho se ha observado la disminución de PTOV1 produce una marcada inhibición de la proliferación celular hasta sus estadios basales⁵.

Existe aparentemente una asociación entre la sobreexpresión de PTOV1, el estado proliferativo y la localización de la proteína en el núcleo celular, en el estudio de Santamaría y cols. 2002 se reporta que en un cultivo celular libre de PTOV1 durante 48 horas de observación la mayoría de células estaban en reposo, con falta de expresión de Ki67 y PTOV 1 con localización citoplasmática con núcleos excluidos de tinción y posteriormente con un estímulo mitogénico se observó que 9 horas posteriores Ki67 se localizó en el núcleo hasta en el

80% de los casos lo cual indica que la célula estaba en la fase S del ciclo celular, mientras que PTOV-1 se observó tanto en el citoplasma como en el núcleo, lo cual indica alguna función a su entrada en este, para la tinción se utilizó una combinación de proteína verde fluorescente y PTOV-1 con lo cual pudo determinarse mediante inmunohistoquímica su localización⁷.

Se cree que PTOV1 permite la traslocación nuclear y la actividad mitogénica de flotilina⁸, la cual es una proteína relacionada con membranas que aparentemente sirven para formar un complejo caveolar, o bien la formación de vesículas, ha sido implicada en la transducción de señales y en procesos de transporte vesicular y puede ser alterada por algunos oncogenes activados (tales como v-Abl y Ha Ras-(G12V))⁹. Se describe la flotilina 1 como una proteína principal de las balsas lipídicas, la cual presenta interacción específica con PTOV1.⁸ Las balsas de lípidos son microdominios de membrana enriquecidos especializados en glicosilfosfolípidos, colesterol y proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol. Ahora se cree que las balsas lipídicas representan una característica central de la organización celular crucial para eventos de tráfico de membrana y de cascadas de señalización específicas¹⁰. Flotillin-1 ha sido implicado en la señalización de la insulina en los adipocitos. La insulina estimula el complejo Cbl-CAP para unirse con flotillin-1 en las balsas de lípidos, y esto genera una señal crucial para la captación de glucosa en los adipocitos, recientemente también se han identificado en fagosomas⁸. Se ha descrito que flotilina 1 y PTOV 1 son necesarias para la proliferación celular normal⁸.

En el estudio de Hye-Sook Youn 2011, se habla sobre la interacción de PTOV1 con MED 25, se describe a la vitamina A y sus derivados como factores importantes en procesos celulares como la diferenciación celular, crecimiento celular, proliferación y apoptosis por lo cual se ha implicado en la prevención del cáncer. MED25 y PTOV1 recíprocamente regulan la actividad transcripcional de RAR (receptor de ácido retinico), modulan diferencialmente sensibilidad RA en células de cáncer en función de sus niveles de expresión, lo que sugiere un posible mecanismo molecular que subyace a la resistencia RA que frecuentemente surge durante los tratamientos contra el cáncer. Se sabe que MED 25 estimula la actividad de RAR y PTOV 1 antagoniza a MED 25 de manera competitiva al unirse a la proteína de unión y que MED25 aumenta, mientras que disminuye PTOV1. Por lo tanto MED25 aumenta la sensibilidad al RA mediante el aumento de la activación de RAR, mientras que PTOV 1 aumenta la resistencia al RA por la supresión del RAR¹¹.

En otro estudio (Yu-Wei Yao 2011) que habla sobre la relación de PTOV1 con UCH-L1 (ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa L1) la cual participa en la maduración de los ovocitos (estudio realizado en ratones), refiere que la proteína PTOV1 era capaz de unirse a UCH-L1 que juega un papel importante en la regulación del ciclo celular, pero su papel en el desarrollo de los ovocitos de mamíferos y en la meiosis todavía no está claro. En dicho trabajo, se encontró que los niveles de expresión de PTOV1 en los ovarios de ratones

aumentó progresivamente en ejemplares prepúberes hasta la edad adulta. Y refieren que su localización fue en el citoplasma y los núcleos de oocitos durante la prepubertad. Además, la UCH-L1 ha demostrado estar asociada con CDK1, que participó en la regulación del ciclo celular y la maduración de los ovocitos. Por lo tanto, proponen que los cambios en la distribución de PTOV1 son dependientes de la edad y es importante para el desarrollo del ratón y la maduración de ovocitos¹².

La proteína sobreexpresada de cáncer de próstata (PTOV1) fue la primera descrita como aumentada en los pacientes con cáncer de próstata pero no en los sanos. Se asocia a un incremento en la proliferación tumoral in vitro e in vivo. Y es útil en la biopsia prostática para detectar el cáncer de manera temprana, Se expresa hasta en el 71% de los carcinomas y en el 80% en neoplasia intraepitelial de alto grado⁵.

En el estudio de Fernández S. et. al. 2011 se analizaron 182 biopsias de las cuales, 168 correspondían a tumores, en busca de PTOV1 y Ki67, incluyeron tumores de alto y bajo grado de pulmón, seno, endometrio, páncreas hígado, piel ovario, colon, estomago, riñón, vejiga y gliomas cerebrales. Se tomó un microarreglo de tejidos sin cáncer como control. Se buscó a PTOV1 para identificar la intensidad y porcentaje de células positivas y Ki67 fue identificado para determinar el índice de proliferación. En el estudio se identificó PTOV1 en el 95% de los tumores analizados y la expresión se relacionó de manera estadísticamente significativa según el grado de tumor ($p=0.014$) y fue más marcada esta relación en el cáncer vesical. Ki67 su expresión se asoció a los tumores de alto grado. De esta forma determinaron que la presencia de PTOV1 y de Ki67 como proteínas que puede fungir como marcadores oncológicos. Este estudio que se hizo para varios tejidos con cáncer concluyó que PTOV1 se sobre-expresaba en la mayoría de los tumores por lo que se podría considerar este como marcador oncogénico asociado a mal pronóstico⁵.

Morote, 2008 en la revista Clinical Cancer Reserch hace referencia sobre la expresión del PTOV-1 en relación con la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado NIP-AG y el desarrollo de cáncer prostático en el cual se hace una determinación semicuantitativa de PTOV-1 en base al H-Score donde identifican que la presencia de PTOV-1 en pacientes con relación estrecha al cáncer de próstata se presenta teñido el núcleo y el citoplasma, por el contrario en los pacientes sin relación con cáncer de próstata solo se identifica PTOV-1 en cantidades significativamente menores en citoplasma. Además identificaron que un score mayor de 100 se ve más relacionado con cáncer de próstata. Se tomaron para la realización tejidos con NIP-AG de los cuales se determinó que los que presentan mayor expresión de PTOV1 se encuentran estrechamente relacionados con el desarrollo de cáncer de próstata; de hecho los que tenían estudio de patología negativo para cáncer de próstata y PTOV1 sobre-expresado, durante el seguimiento se confirmó mediante biopsia Ca prostático,

por el contrario pacientes con NIP-AG con PTOV1 poco expresado presentaron en su seguimiento biopsias negativas a neoplasia. El promedio de HSCORE para PTOV1 fue de 151 con rango de 20-250 y mediana de 160 para los positivos y de 94 con rango de 0-220 con mediana de 100 en los negativos lo que nos sugiere que la sobre-expresión de PTOV1 en muestras con NIP-AG es significativamente mayor cuando estas lesiones se relacionan con cáncer prostático, por lo tanto la determinación de PTOV-1 puede predecir el desarrollo de cáncer de próstata en pacientes con NIP-AG aislado. El seguimiento que se dio a sus pacientes fue de 1-23 meses. En el mismo estudio se realizó una comparación de múltiples variables en pacientes con biopsia prostática y de estos los que presentaron Ca prostático y otros que no, de estas variables la única que muestra diferencia significativa fue la determinación de PTOV1 (Ver tabla 1).

Análisis sobre el comportamiento de las variables de acuerdo a la detección de cáncer durante el seguimiento de pacientes con lesiones aisladas HG-PIN en la biopsia con aguja.			
Variables	Sin cáncer	Con cáncer	P
Edad	69 +/- 6 (47-71)	71 +/- 6 (61-71)	0.275
APE basal	7.0 +/-1.5 (4.1-27.7)	8.2 +/- 3.1 (5-56.5)	0.106
APE final	7.4 +/- 2.5 (2.4-23.7)	9.1 +/- 5.6(4.1-59.7)	0.140
Velocidad APE	0.08+/- 1.8 (-14.4 a 9.2)	0.80 +/- 1.9 (-5.4 a 7.1)	0.574
No biopsias	2 +/- 0.5 (2-4)	2 +/- 0.5 (2-4)	0.686
Seguimiento	13 +/- 2 (1-24)	13 +/- 2 (1-23)	0.166
PTOV-1	100 +/- 40 (0-220)	150 +/-52 (20-250)	0.001
NIP-AG Multifocal	18/39 (46.2)	8/11 (72.7)	0.175
Tomado de Morote J. et. al. PTOV1 Expression Predicts Prostate Cancer in Men With Isolated High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia in Needle Biopsy; Clin Cancer Res 2008;14(9) 2617-2622			

De este estudio se desprende que tomando un umbral HSCORE de 100 se tiene una sensibilidad de 90%, y una especificidad del 51.3%, con un valor predictivo positivo de 34.5%, un valor predictivo negativo de 95.2% y una tasa alta de biopsias negativas lo cual podría disminuir un número considerable de estas⁶.

La forma en que se han diseñado estos estudios es en base a la tinción de las células, en el estudio de Mazzuchelli y cols. 2011 donde se evaluó PTOV1 y Ki-67, este último como control de replicación, se tiñeron los portaobjetos en un inmunoteñidor automático (DakoCytomation, Dinamarca), utilizando un anticuerpo policlonal anti-PTOV1 (con dilución 1:50, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) y anticuerpo Ki-67 (clon MIB-1 [antígeno monoclonal de ratón anti-humano Ki67]). Los anticuerpos unidos se detectaron con sistemas específicos y con uso de controles negativos como anticuerpos de conejo no específicos los cuales dieron resultados negativos en todos los casos ensayados y fueron vistos a 400x al microscopio.¹³ Lo observado a su vez fue evaluado por el sistema HSCORE el cual es un método semicuantitativo, realizado con

microscopio de luz convencional, el cual se basa en el porcentaje de núcleos positivos y la intensidad de la tinción. Se ha utilizado de manera adecuada en cáncer de seno. Posteriormente se realiza una fórmula HSCORE = 3(% de núcleos teñidos intensamente) + 2(% de núcleos teñidos moderadamente) + 1(% de núcleos teñidos débilmente). El resultado va de 0-300¹⁴.

Planteamiento del problema:

Para la detección de cáncer de próstata existen pruebas que nos orientan ante su presencia, la cual debe ser confirmada por estudio de patología; sin embargo aún el reporte de patología puede indicarnos un diagnóstico negativo a malignidad ante un paciente que en realidad presente desarrollo de esta neoplasia, para ello existen esfuerzos con la finalidad de determinar algún recurso que nos proporcione orientación adecuada sobre quien presenta o puede presentar desarrollo de células neoplásicas y quien no, particularmente aquellos pacientes que se encuentran con alteraciones de pruebas sanguíneas sin tumor evidente, de aquí la importancia para identificar algún marcador el cual pueda cumplir con esta necesidad. Se ha elegido la determinación de la proteína PTOV1 en pacientes del sexo masculino a los cuales se les ha realizado biopsia prostática transrectal secundario a alteraciones del antígeno prostático con evidencia macroscópica de lesión maligna y otros con evidencia de ausencia de malignidad, en el servicio de urología del Hospital Juárez de México, tomando el periodo octubre de 2012 y mayo de 2013, con la finalidad de determinar la presencia de esta proteína y su facultad de predecir el desarrollo de cáncer para después diseñar un estudio prospectivo que determine su factibilidad.

Justificación.

Se trata de un estudio piloto en el cual analiza la expresión de la proteína PTOV1 que pueda apoyar para la detección oportuna del cáncer prostático. Este puede servir para el desarrollo de un trabajo prospectivo, basado en la selección de pacientes por el nivel de Antígeno Prostático Específico (APE), con indicación de realización de biopsia prostática transrectal, con un tamaño adecuado de muestra que ofrezca resultados epidemiológicos válidos; así como su división de acuerdo a escala de Gleason.

Hipótesis.

La expresión de la proteína PTOV1 se encontrara elevada en tejidos con cáncer prostático en comparación con los pacientes sin cáncer.

Objetivos

Objetivo General.

- Analizar la expresión de la proteína PTOV1 como posible marcador tumoral en pacientes con cáncer de próstata en población mexicana.

Objetivos específicos.

- Clasificar laminillas del servicio de patología del Hospital Juárez de México en positivas y negativas a cáncer de próstata.
- Análisis de la inmunohistoquímica para la proteína PTOV 1 en ambos grupos.
- Determinar el valor de PTOV1 en tejido prostático positivo a cáncer prostático.
- Determinar el valor de PTOV1 en tejido prostático negativo a cáncer.
- Determinar la utilidad de PTOV1 para identificar cáncer prostático.
- Correlacionar los datos de expresión de la proteína PTOV1 con los datos histopatológicos.

Diseño del estudio:

Se trata de un estudio retrospectivo, transversal y experimental.

Criterios de inclusión:

- Pacientes positivos a cáncer prostático. Con reporte histopatológico.
- Material con celularidad adecuada.
- Ser paciente mexicano por lo menos en dos generaciones.
- Cáncer prostático de novo.
- Edad indistinta.
- Sin tratamiento previo.

Criterios de exclusión.

Que hayan recibido tratamiento.

Pacientes con nacionalidad diferente a la mexicana.

Pacientes con antecedentes de otras neoplasias diferentes al cáncer de próstata.

Material y métodos.

Tamaño de la muestra.

Se incluyeron 12 muestras de bloques de parafina del servicio de patología positivas a cáncer de próstata, con un total de 12 muestras, así como también tejido prostático de biopsias o de RTUP negativos a cáncer de próstata como control.

Procesamiento del tejido.

Se realizaron cortes de 0.22 micras de los bloques de parafina y se montaron en laminilla electrocargadas. Se incubaron durante 30 min a 60°C, posteriormente se hidrataron sumergiéndolas en las siguientes soluciones:

Xilol	20min
Alcohol 100%	10 min
Alcohol 96%	10 min
Alcohol 70%	10 min
Alcohol 50%	10 min
Agua	10 min

Posteriormente se sumergieron en un Koplín con solución recuperadora de antígeno (buffer citrato pH 6.0), se hirvieron a presión por 15 minutos. Se dejó enfriar y se lavaron con agua destilada durante 5 min y posteriormente con PBS-T por 15 minutos. Se realizó la inhibición de la actividad de la peroxidasa endógena tratándolas con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% a temperatura ambiente por 15 minutos. Se lavó con PBS-T por 15 min. Se realizó el bloqueo de uniones inespecíficas con BSA al 10% en PBS-T por 60 minutos. Se aplicó el anticuerpo primario PTOV1 1:50 y al mismo tiempo se aplica PBS-T a otro tejido como control negativo. Se incubaron toda la noche a 4°C posteriormente se lavaron con agua destilada durante 5 min. sin dejar secar en ningún momento. Se lavó 2 veces con PBS-T por 10 minutos y con PBS por 10 minutos. Se adicionó el anticuerpo secundario rabbit IgG-HRP: sc-2749, Santa cruz diluido 1:400 en PBS. Se incubó a temperatura ambiente durante 60 min. en cámara húmeda. Se lavó 2 veces la laminilla para retirar el anticuerpo secundario con PBS-T y una con PBS por 10 minutos. El revelado se realizó secando la superficie inferior de la laminilla, se agregó la solución DAB reveladora (1ml de Buffer sustrate + 2 gotas de DAB 3': 3'-diaminobenzidina marca Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System N° de catálogo K3468) y vigiló bajo el microscopio óptico la reacción enzimática. Se esperó por un tiempo máximo 5 min. Se frenó la reacción con agua destilada. Se lavó con agua y contratiñó adicionando 1 ml de hematoxilina por 5 segundos.

Se deshidrato sumergiendo las laminillas en las siguientes soluciones:

Agua	10 min
Alcohol 50%	10 min
Alcohol 76%	10 min
Alcohol 96%	10 min
Alcohol 100%	10 min
Xilol	20 min

Se montó con cubreobjetos y entelan con cuidado de no formar burbujas.

Nota cada laminilla tiene su control sin anticuerpo y con anticuerpo del mismo tejido.

Reactivos:

PTOV1 Polyclonal Antibody Species Reactivity, Human (Hu) and Murine (Ms). Applications Western Blot (WB) dilution 1:100-500 and Immunohistochemistry (IHC) dilution 1:50-100. Thermo Scientific de USA Catalog Number: PA5-24243, Size: 100 ug, Class: Polyclonal, Type: Antibody, Clone:Host /Isotype: Rabbit / Ig Immunogen: Synthetic peptide from the N-terminal region of human PTOV1 conjugated to KLH.

Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System N° de catálogo K3468.

Solución de PBS-T: Se adiciona 100 µl de Tween 20 a un litro de PBS.

Solución bloqueante: Se pesan 10 g de BSA (Bovine Serum Albumin) y disuelven en 100 ml de agua bidestilada.

Métodos estadísticos.

Para el análisis se tomaron impresiones fotográficas con objetivo 40X, las cuales fueron sometidas a análisis de densidad con el programa Image-Pro Plus versión 6.1, para realización del cálculo de la densidad óptica integrada (OID), con la cual se determinó la concentración de PTOV1 en las células inmunoteñidas, posteriormente se aplicó el promedio de las mediciones del OID y el área medida y se graficó.

Consideraciones éticas.

El desarrollo de este estudio no presenta riesgo para los pacientes ya que se tomaran muestras de tejido prostático de biopsias transrectales o resección transuretral de próstata indicada por criterios médicos y que previamente han sido procesados por el servicio de patología del Hospital Juárez de México en donde se encuentran en resguardo.

No se requiere consentimiento informado ya que se utilizará tejido que tiene como resguardo el servicio de patología del Hospital Juárez de México y que fue tomado por indicación médica y no como criterio para inclusión de este estudio.

Cronograma.

2012	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero
Elaboración de protocolo						
Registro						
Captación de información						
Análisis de resultados						
Entrega del informe final						
Envío a publicación						

2013	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio
Elaboración de protocolo						
Registro						
Captación de información						
Análisis de resultados						
Entrega del informe final						
Envío a publicación						

Resultados y discusión.

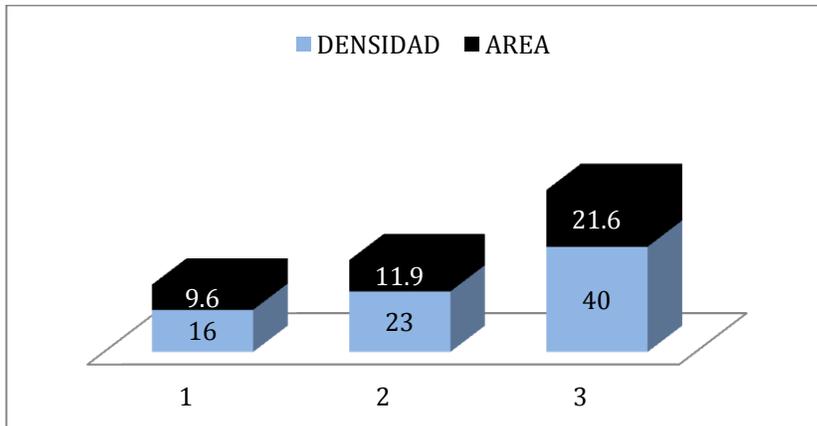
Se incluyeron un total de 12 pacientes positivos de adenocarcinoma prostático, con edades de los 51 a los 80 años con un promedio de 70.5 años. De acuerdo a la clasificación Gleason se presentaron con rango de 6 a 9; siendo Gleason 7 el más frecuente en 8 de los 12 casos (66%), le siguen Gleason 8 en 2 casos (17%) y Gleason 6 y 9 uno por grado (8.5%), de estos al valor del APE tiene rango de 5 a 104 ng/dl con un promedio de 34 ng/dl.

Se realizaron 3 mediciones por laminilla (por paciente) de los cuales se calculó el promedio para la realización de las gráficas. Se observó que todos los pacientes eran positivos a la tinción por el anticuerpo anti PTOV 1. Esta observación la hicieron Fernández y cols. (2011) quienes reportaron se encontraba sobreexpresada en tumores malignos de alto grado de los tejidos: pulmón, mama, endometrio, páncreas, hígado, piel, ovario, colon, estómago, los gliomas del riñón, la vejiga, y cerebral. Lo cual apoya lo encontrado en este trabajo.

Se realizaron las mediciones de la densidad óptica integrada y del área, la cual representa la concentración de la proteína que se encuentra. A continuación se muestran las gráficas encontradas de los 12 pacientes.

Observamos en el primer paciente en el eje X los 3 valores promedios que fueron realizados para la misma muestra y donde se pretende observar la OID en cada una, la cual osciló entre 16 y 40, en relación a un área entre 9.6 y 21.6. Sin embargo para el primer bloque se hicieron un total de 2951 mediciones con un mínimo de densidad óptica de 0.1 y un máximo de 1098, para la segunda área se hicieron 5415 mediciones con un mínimo de densidad óptica y 0.6479 y un máximo 3802. El tercer bloque contó con 2345 mediciones con un mínimo de 0.5 y máximo de 3154.

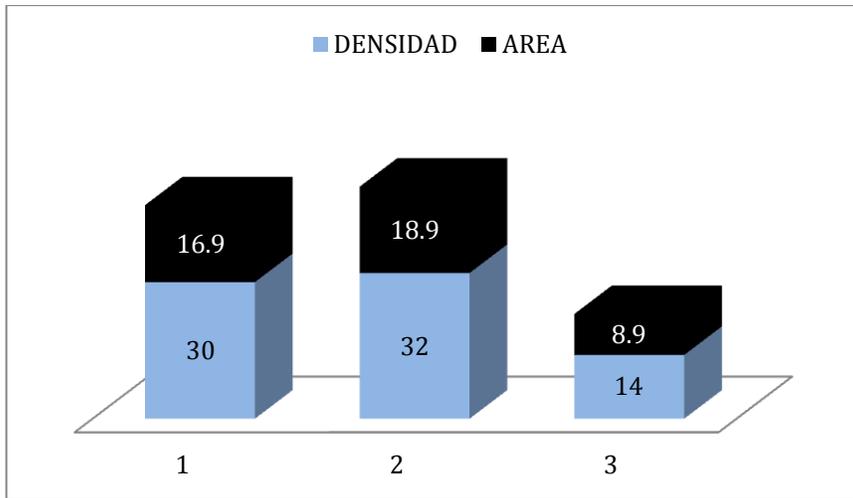
PACIENTE 1



Valores promedio de densidad óptica integrada y área.

Para el paciente numero 2 observamos densidades con promedio de 14 a 32, y promedio de área entre 8.9 y 18.9. Los rango fueron para la primer área un mínimo de 0.45 y máximo de 1531 con un total de 2281 mediciones, para la segunda el mínimo fue de 0.41, máximo de 10241, con un total de 2541 mediciones, para la tercera mínimo de 0.37, máximo de 1414 con un total de 2661 mediciones.

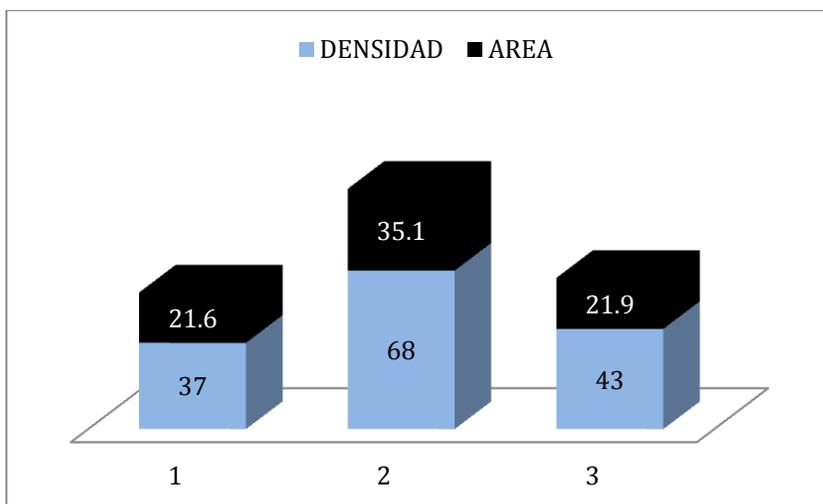
PACIENTE 2



Valores promedio de densidad óptica integrada y área.

En el paciente 3 se reportan un promedio de densidad óptica de 37 a 68, para áreas de 21.6 a 35.1. Los rangos fueron para la primer área mínimo de 0.4, máximo 1044, con un total de 619 mediciones; para la segunda área un mínimo de 0.6, máximo de 6625 con un total de 648 mediciones y la tercera área mínimo de 0.3, máximo de 1229 para un total de 869 mediciones.

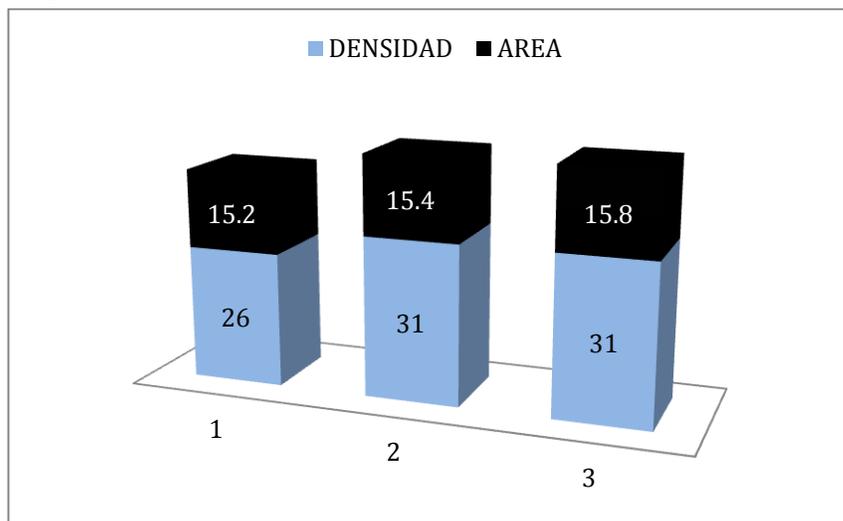
PACIENTE 3



Valores promedio de densidad óptica integrada y área.

En el paciente 4 se observan promedios de densidad de 26 a 31 para áreas de 15.2 a 15.8. Los rangos oscilaron para la primer área con mínimo de 0.4, máximo 576 con un total de 1045 mediciones; para el área 2 un mínimo de 0.6, máximo de 576 con 1045 mediciones y la tercera área mínimo de 0.3, máximo 416 con 1572 mediciones.

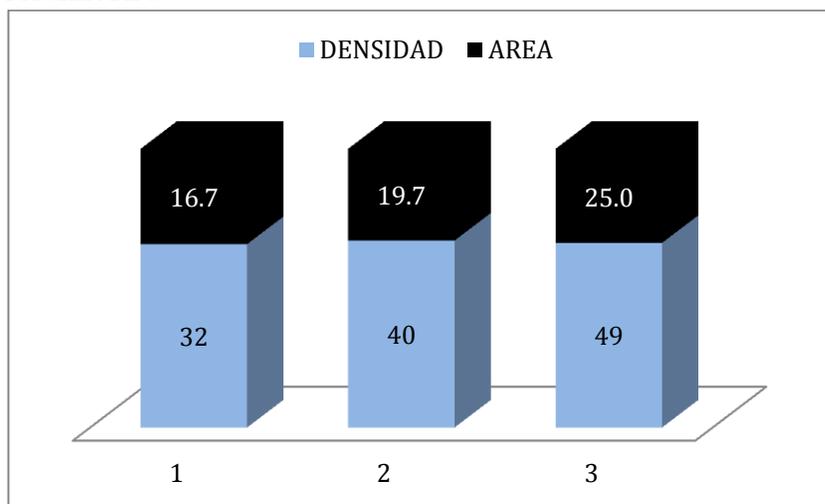
PACIENTE 4



Valores promedio de densidad óptica integrada y área.

Los promedios de densidad en el paciente 5 fueron de 32 a 49, para áreas entre 16.7 a 25. Los rangos se reportan para la primer área mínimo de 0.5, máximo 1976, mediciones 2393; segunda área mínimo 0.5, máximo 2003, 2033 valores; tercera área mínimo 0.5, máximo 5500, 677 mediciones.

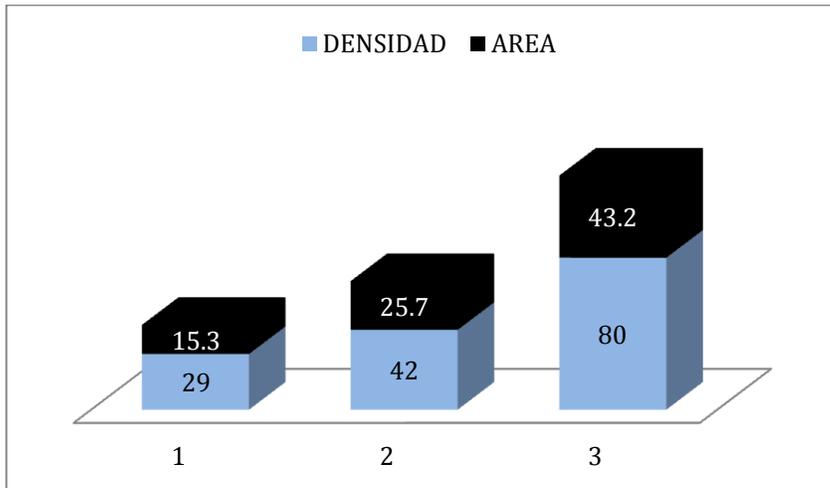
PACIENTE 5



Valores promedio de densidad óptica integrada y área.

En el paciente 6 los promedios son densidad de 29 a 80, para área de 15.3 a 43.2. Los rangos son como sigue: primer área mínimo 0.5, máximo 988, 1615 mediciones; segunda área mínimo 0.3, máximo 8902, 1377 mediciones; tercera área mínimo 0.4, máximo 11742, 1065 mediciones.

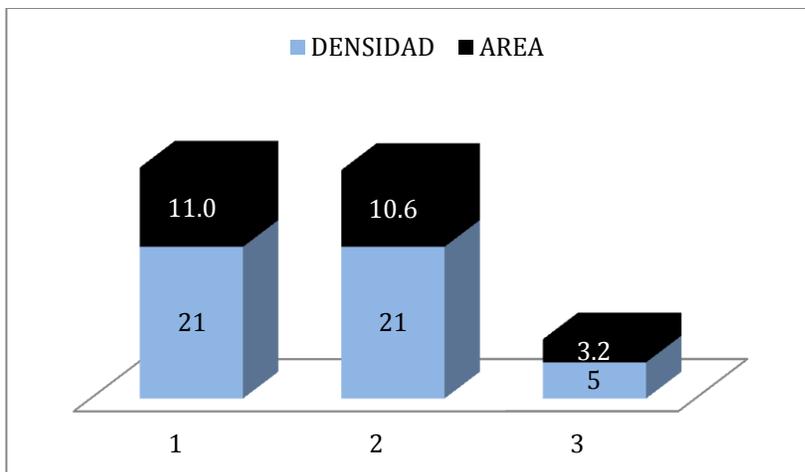
PACIENTE 6



Valores promedio de densidad óptica integrada y área.

Paciente 7. Los promedios de densidad van de 5 a 21, con áreas de 3.2 a 11. Los rangos son para el área 1 mínimo de 0.6, máximo 4130, 1743 mediciones; segunda área mínimo 0.5, máximo 313, 643 mediciones; tercer área mínimo de 0.3, máximo 461, 1416 valores.

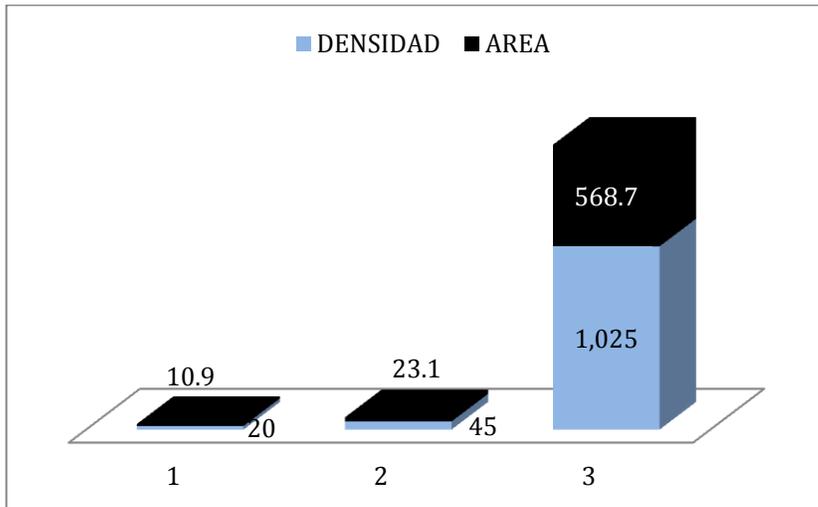
PACIENTE 7



Valores promedio de densidad óptica integrada y área.

Paciente 8 presentó promedio de densidad de 20 a 1025, con áreas de 10.9 a 568.7. Rangos para primer área mínimo de 0.5, máximo 518, 1325 mediciones; segunda área mínimo 0.6, máximo 662, 745 mediciones; tercer área mínimo 9, máximo 12605, 535 mediciones.

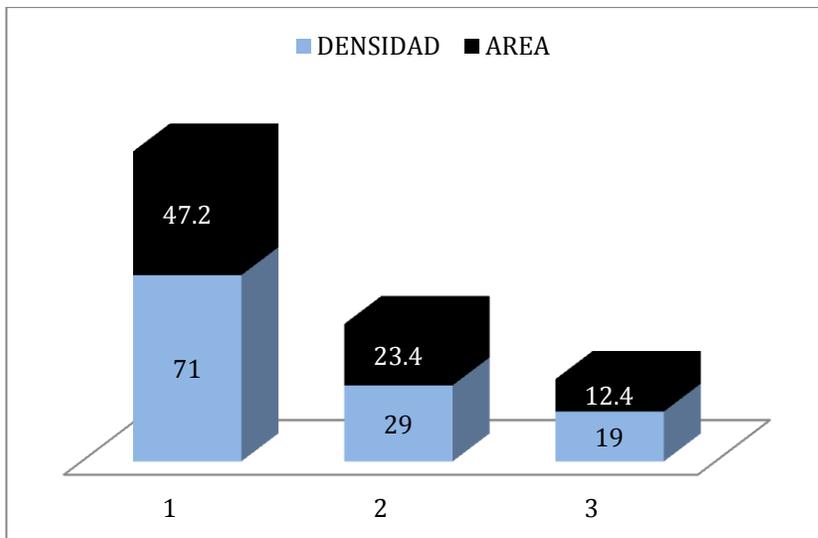
PACIENTE 8



Valores promedio de densidad óptica integrada y área.

El paciente 9 presentó un promedio de densidad entre 19 y 71, para áreas entre 12.4 y 47.2. Los rangos van para la primer área mínimo de 0.1, máximo de 15908, 2337 mediciones; segunda un mínimo de 0.1, máximo 33530, 3722 mediciones; tercera un mínimo de 0.2, máximo 1052, 2754 mediciones.

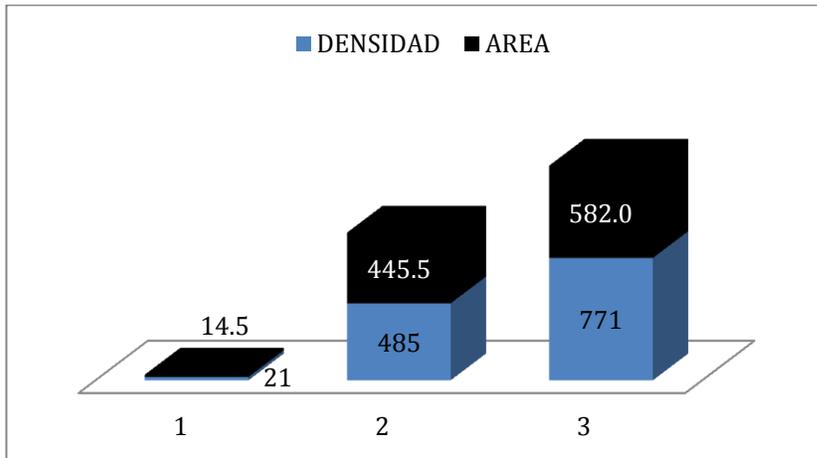
PACIENTE 9



Valores promedio de densidad óptica integrada y área.

El paciente 10 presentó un promedio de densidad entre 21 y 771, para áreas entre 14.5 y 582. Los rangos van para la primer área mínimo de 0.3, máximo de 910, 2011 mediciones; segunda un mínimo de 4, máximo 90727, 1597 mediciones, tercera un mínimo de 7, máximo 122 177, 1026 mediciones.

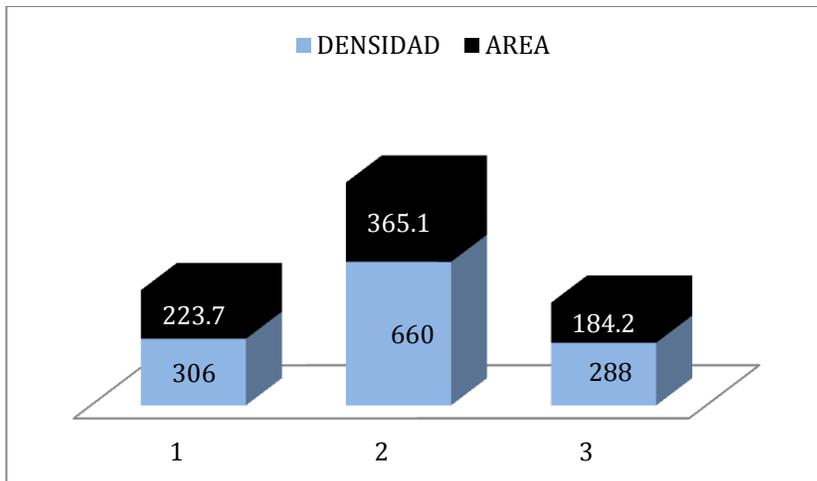
PACIENTE 10



Valores promedio de densidad óptica integrada y área.

El paciente 11 presentó un promedio de densidad entre 288 y 306, para áreas entre 184.2 y 365.1. Los rangos van para la primer área mínimo de 5, máximo de 14256, 1576 mediciones; segunda un mínimo de 8, máximo 26983, 2518 mediciones, tercera un mínimo de 6, máximo 18382, 1501 mediciones.

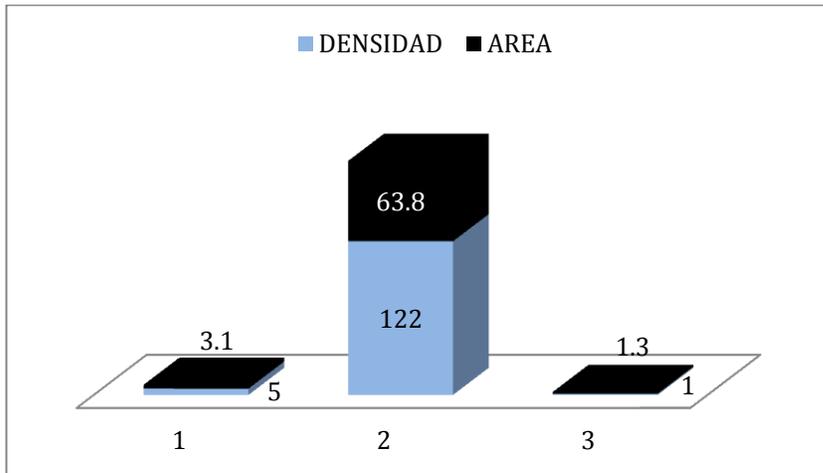
PACIENTE 11



Valores promedio de densidad óptica integrada y área.

El paciente 12 presentó un promedio de densidad entre 1 y 122, para áreas entre 1.3 y 63.8. Los rangos van para la primer área mínimo de 0.4, máximo de 271, 1295 mediciones; segunda un mínimo de 13, máximo 7622, 324 mediciones, tercera un mínimo de 0.1, máximo 54, 5720 mediciones.

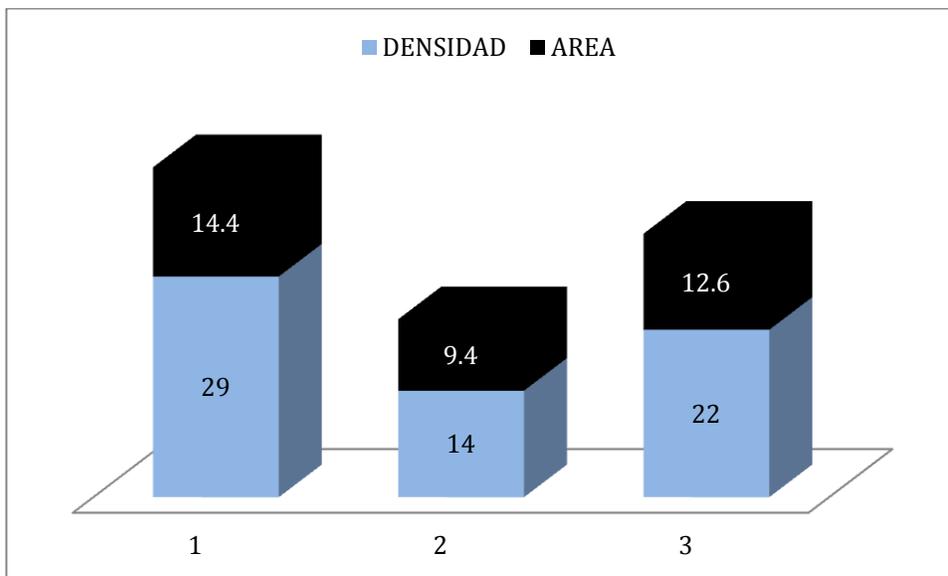
PACIENTE 12



Valores promedio de densidad óptica integrada y área.

El paciente negativo a cáncer presentó un promedio de densidad entre 14 y 29, para áreas entre 9.4 y 14.4. Los rangos van para la primer área mínimo de 0.6, máximo de 274, 307 mediciones; segunda un mínimo de 0.3, máximo 206, 671 mediciones, tercera un mínimo de 0.3, máximo 531, con 349 mediciones.

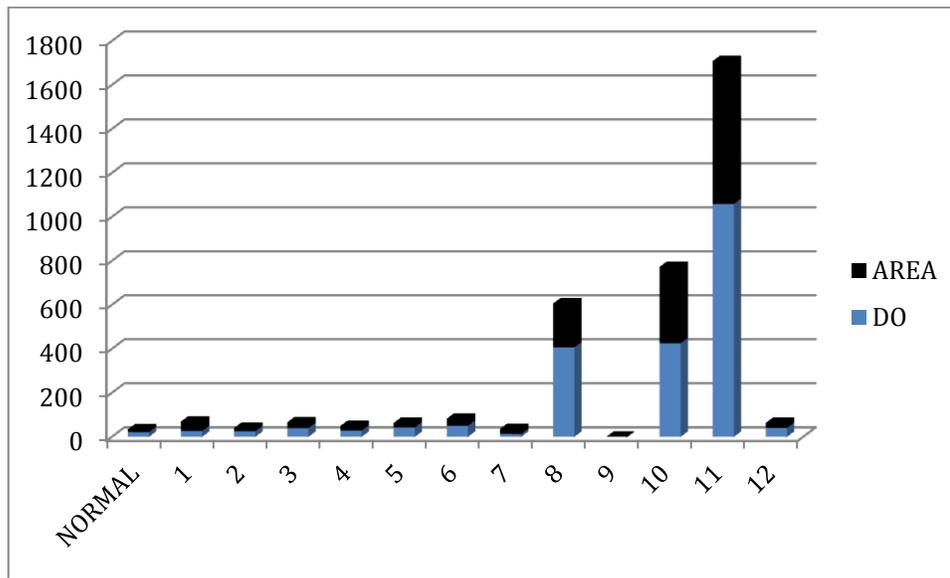
NORMAL



Valores promedio de densidad óptica integrada y área.

Para la realización de esta gráfica se promediaron las 3 mediciones que se realizaron por tejido de paciente. Podemos observar representatividad únicamente en los pacientes 8, 10 y 11 con respecto al normal que es el primero de la gráfica. Los valores promedios del resto se encuentran en parámetros similares al control.

En el control normal observamos valores de expresión basales. Según lo reportado en el estudio de Mazzuchelli y cols. 2011 donde se indica la expresión normal de la proteína y se analiza la sobre expresión tomando el HSCORE para sus mediciones.



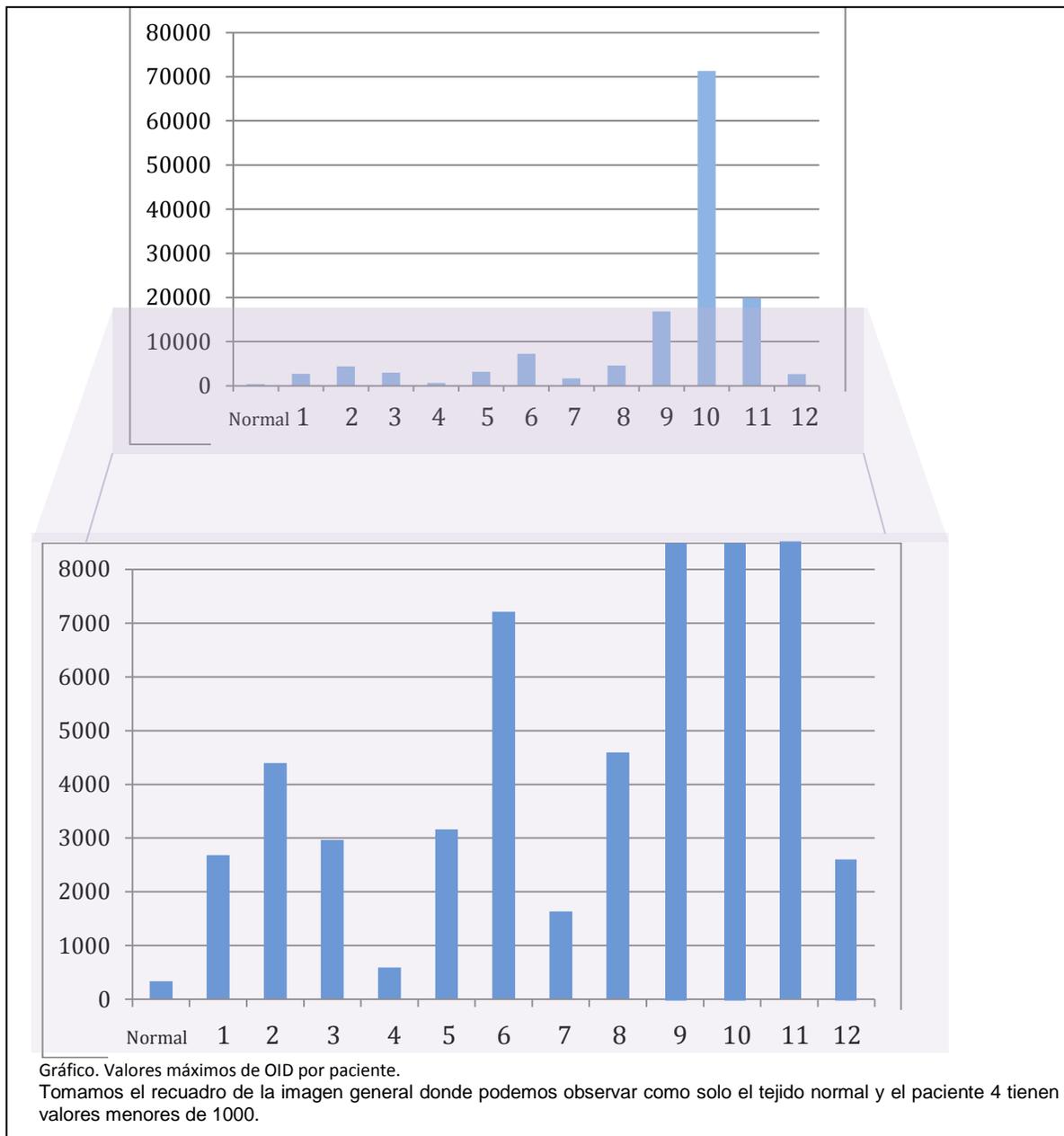
Expresión de la proteína a través de la densidad óptica y área de medición de los pacientes y el control promedios.

Sin embargo debemos observar que los rangos son muy amplios lo que nos lleva a pensar que a pesar de tener valores muy elevados, el promedio es muy bajo, porque en realidad son pocas las mediciones que tomaron el tejido con aumento de la expresión de la proteína, y el resto tomó datos de células con poca expresión; es decir, se contabilizaron células sin expresión de malignidad y con expresión de malignidad dentro del mismo tejido.

En el paciente 12, se puede observar que de las 3 áreas medidas solo una presenta densidades altas y las otras 2 particularmente la tercera densidades muy bajas, ejemplo esto de la medición de zonas con expresión tumoral y sin ella.

Es interesante observar que todos los tejidos positivos -excepto del paciente 4- presentan en algún área con valores de densidad por arriba de 1000, con el paciente 10 se alcanzó el valor máximo de 71271. Sería interesante relacionar

en otro trabajo el grado de Gleason y el valor de la proteína, con la finalidad de identificar si es que a mayor grado existe un aumento directamente proporcional de la proteína PTOV1.



En cuanto al valor de APE y su relación con el Gleason resulta la siguiente tabla. Donde se puede observar relación entre el valor de Gleason y el valor de la densidad óptica integrada obtenida y la cual aparentemente tiene una relación directamente proporcional. Sin embargo se necesitara una revisión más adecuada y en un mayor número de muestras para determinar esta relación.

Paciente	OID	Gleason reportado
Normal	337.06	Negativo
1	2684.99667	7(3+4)
2	4395.63467	7(3+4)
3	2966.50233	7(3+4)
4	593	6(3+3)
5	3159.852	7(3+4)
6	7210.66667	7(4+3)
7	1634.81023	7(3+4)
8	4595.27667	7(3+4)
9	16830.3503	8(4+4)
10	71271.4733	9(4+5)
11	19874.5033	8(4+4)
12	2649.15987	7(3+4)

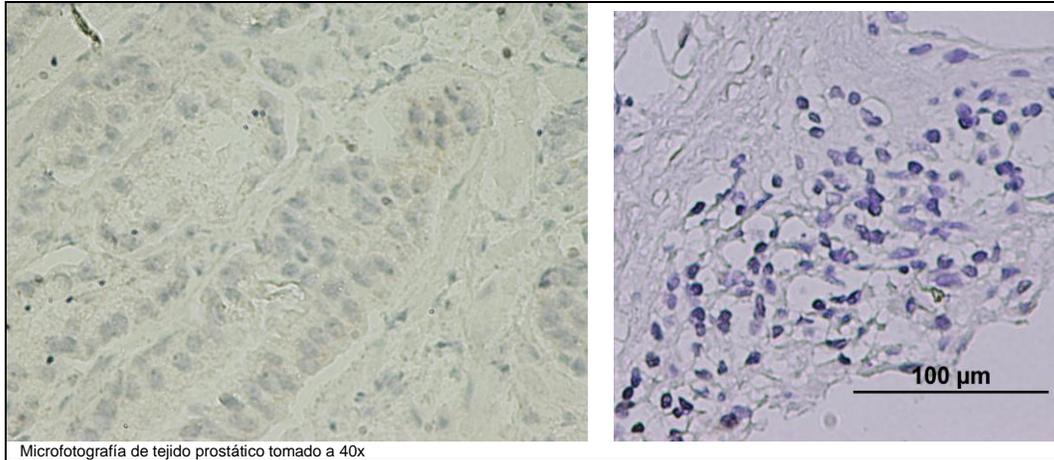
Tabla 1. Relación entre OID y Gleason por paciente

Conclusión

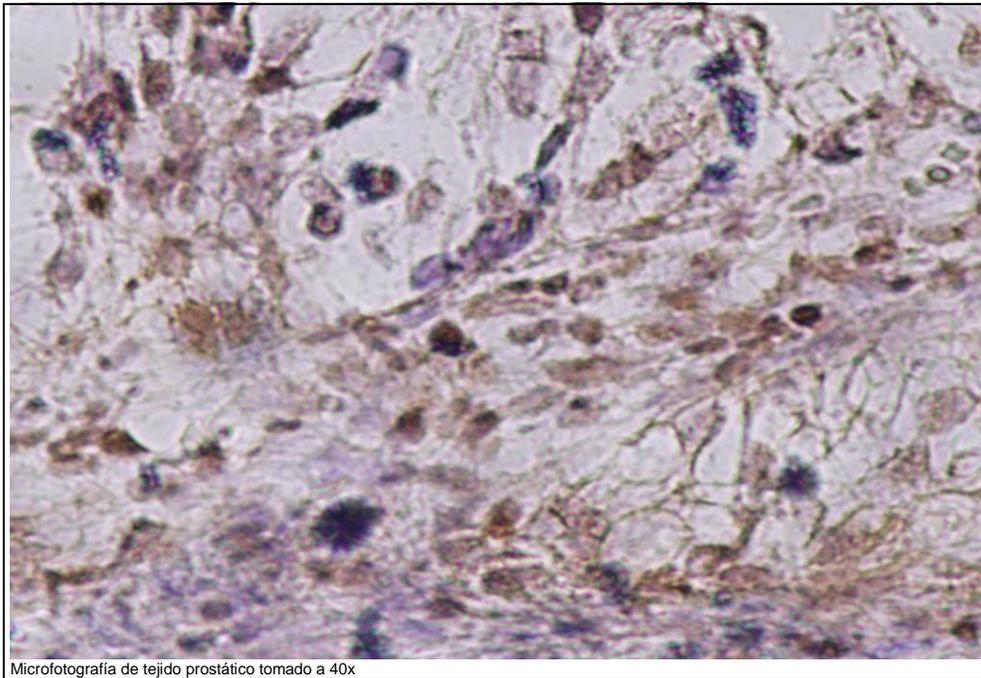
La finalidad de este estudio piloto es identificar el aumento de la proteína PTOV 1 en pacientes con adenocarcinoma prostático en población mexicana, que sea la base y siembre la inquietud para la realización de un estudio prospectivo, longitudinal, que tomé en cuenta la escala de Gleason y la relación con el aumento del PTOV1, además se utilice a la par algún marcador de daño tumoral para poder identificar solamente células neoplásicas y tener datos más confiables. Es importante mencionar que los rangos fueron muy amplios porque se tomaron dentro del tejido tumoral medidas de células malignas y benignas estas últimas presentan menos expresión, valdría la pena el apoyo por patología para identificar los grupos celulares positivos a los cuales deberá aplicarse el anticuerpo y así los valores sean más homogéneos para que sea factible aplicar pruebas estadísticas que indiquen de manera confiable la relación entre el desarrollo de adenocarcinoma prostático y PTOV1.

Anexos:

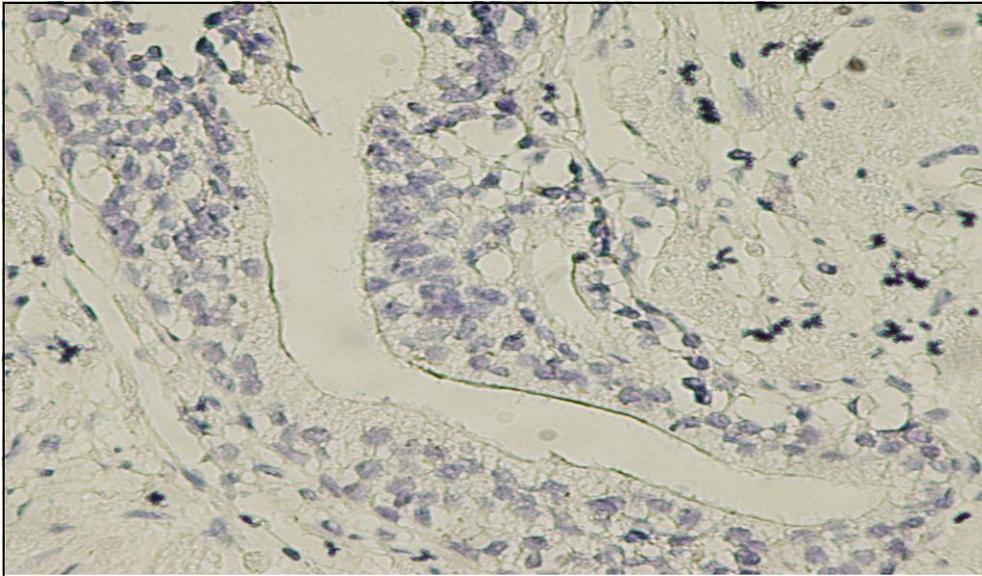
Anexo 1 Fotografías



Fotografía 1: Tejido normal sin anticuerpo

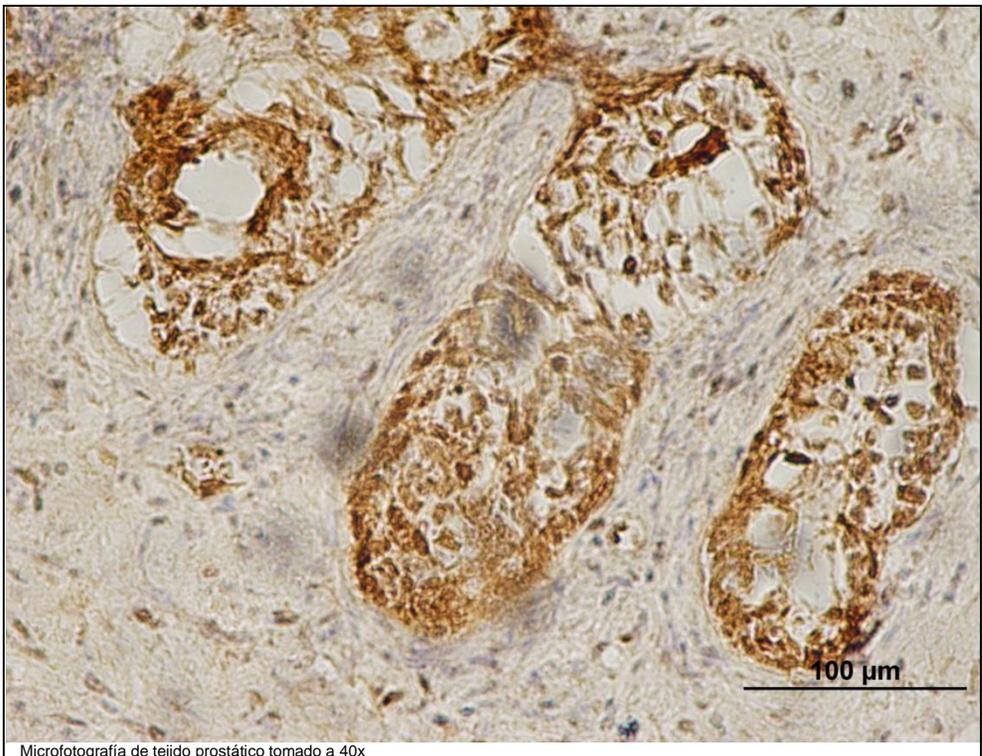


Fotografía 2: Tejido sin adenocarcinoma con anticuerpo.



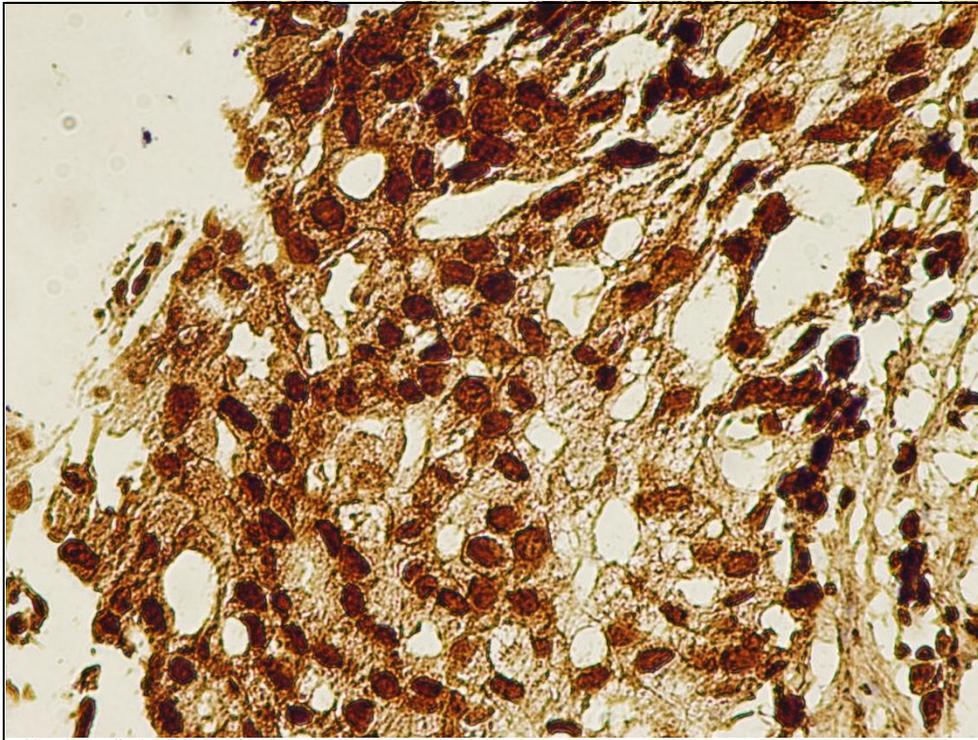
Microfotografía de tejido prostático tomado a 40x

Fotografía 3: Tejido con adenocarcinoma sin anticuerpo



Microfotografía de tejido prostático tomado a 40x

Fotografía 4: Tejido positivo a adenocarcinoma prostático con anticuerpo



Microfotografía de tejido prostático tomado a 40x

Tejido positivo a adenocarcinoma con anticuerpo.

Anexo 2

Tablas del promedio densidad óptica integrada por paciente.

Control normal			
	1a	2a	3a
Mínimo	0.6446483	0.339798	0.3473107
Máximo	274.0000	206.1800	531.0000
Promedio	29.0000	14.0000	22.0000
Num valores	307.0000	671.0000	349.0000

Paciente 1			
	1a	2a	3a
Mínimo	0.1159	0.6479	0.5116
Máximo	1098.3670	3802.6230	3154.0000
Promedio	16.0000	23.0000	40.0000
Num valores	2951.0000	5415.0000	2345.0000

Paciente 2			
	1a	2a	3a
Mínimo	0.4589	0.4113	0.3782
Máximo	1531.4890	10241.0000	1414.4150
Promedio	30.0000	32.0000	14.0000
Num valores	2281.0000	2541.0000	2661.0000

Paciente 3			
	1a	2a	3a
Mínimo	0.4297	0.612	0.3491
Máximo	1044.6810	6625.0000	1229.8260
Promedio	37.0000	68.0000	43.0000
Num valores	619.0000	648.0000	869.0000

Paciente 4			
	1a	2a	3a
Mínimo	0.4607	0.6339	0.3818
Máximo	787.0000	576.0000	416.0000
Promedio	26.0000	31.0000	31.0000
Num valores	1078.0000	1405.0000	1572.0000

Paciente 5			
	1a	2a	3a
Mínimo	0.542	0.5637	0.5487
Máximo	1976.0000	2003.0860	5500.4700
Promedio	32.0000	40.0000	49.0000
Num valores	2393.0000	2033.0000	677.0000

Paciente 6			
	1a	2a	3a
Mínimo	0.5238	0.3911	0.464
Máximo	988.0000	8902.0000	11742.0000
Promedio	29.2926	42.0000	80.0000
Num valores	1615.0000	1377.0000	1065.0000

Paciente 7			
	1a	2a	3a
Mínimo	0.6075	0.5342	0.3354
Máximo	4130.0000	313.4307	461.0000
Promedio	21.0000	21.0000	5.0000
Num valores	1743.0000	643.0000	1416.0000

Paciente 8			
	1a	2a	3a
Mínimo	0.55411	0.6689	9.0000
Máximo	518.0000	662.0000	12605.8300
Promedio	20.0000	45.0000	1025.4965
Num valores	1325.0000	745.0000	535.0000

Paciente 9			
	1a	2a	3a
Mínimo	0.176	0.138	0.2143
Máximo	15908.3400	33530.0000	1052.7110
Promedio	71.0000	29.0000	19.0000
Num valores	2337.0000	3722.0000	2754.0000

Paciente 10			
	1a	2a	3a
Mínimo	0.3472	4.0000	7.0000
Máximo	910.0000	90727.4200	122177.0000
Promedio	20.7759	485.0000	770.9846
Num valores	2011.0000	1597.0000	1026.0000

Paciente 11			
	1a	2a	3a
Mínimo	5.0000	8.0000	6.0000
Máximo	14256.8900	26983.6900	18382.9300
Promedio	306.0000	660.0000	288.0000
Num valores	1576.0000	2518.0000	1501.0000

Paciente 12			
	1a	2a	3a
Mínimo	0.4448642	13.3116	0.1191
Máximo	271.4796	7622.0000	54.0000
Promedio	5.0000	122.0000	1.0000
Num valores	1295.0000	2277.0000	5720.0000

Bibliografía

- 1.- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, Av. Héroe de Nacozari Sur Núm. 2301 Fracc. Jardines del Parque, C.P. 20276 Disponible en <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2781&ep=51>.
- 2.- Salud de la mujer. Nota descriptiva No.334; Organización Mundial de la Salud, Noviembre de 2009. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs334/es/index.html>.
- 3.- “Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer” Instituto Nacional de Estadística y Geografía; México D.F. Febrero de 2010, disponible en <http://www.ceprec.org/CancerMx2010.pdf>
- 4.- Benedit P. et. al. PTOV1 a novel protein overexpressed in prostate cancer containing a new class of protein homology blocks. *Oncogene* 2001; 20:1455-1464.
- 5.- Fernández S. PTOV1 is overexpressed in human high-grade malignant tumors *Virchows Arch* (2011) 458:323–330.
- 6.- Morote, J; PTOV1 Expression Predicts Prostate Cancer in Men with Isolated High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia in Needle Biopsy; *Clin Cancer Res* 2008;14(9) 2617-2622
- 7.- Santamaria, A. et. al. PTOV-1 a Novel Protein Overexpressed in Prostate Cancer, Shuttles between the Cytoplasm and the Nucleus and Promotes Entry into the S Phase of the Cell Division Cycle, *AJP* 2003;162(3) 897-905.
- 8.- Santamaria, A. et. al. PTOV1 Enables the Nuclear Translocation and Mitogenic Activity of Flotillin-1, a major Protein of Lipid Rafts, *Mol Cell Biol* 2005; 25(5) 1900-1911.
- 9.- Volonté, D. et. al. Flotillins/Cavatellins Are Differentially Expressed in Cells and Tissues and Form a Hetero-oligomeric Complex with Caveolins *in Vivo*, *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(18) 12702-12709.
- 10.- Simons, K. Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction 2000 *Mol.Cell. Biol* 1: 31-39
- 11.- Hye-Sook Youn et. al. PTOV1 Antagonizes MED 25 in RAR Transcriptional Activation, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011; 404:239-244.

12.- Yu-Wei Yao et. al., PTOV1 is associated with UCH-L1 and iin response to strogen stimuli during the mouse oocyte development, Histochem. Cell. Biol. 2011; 136: 205-2015.

13.- Mazzuchelli, R. Immunohistochemical expresión of prostate tumor overexpressed 1 in cystoprostatectomies with incidental and insignificant prostate cáncer. Further evidence for field effect in prostatic carcinogénesis, Human Pathology 2011; 42:1931-1936.

14.- Pérez, V. M. et al, Diagnóstico Histopatológico y Factores Pronóstico en Cáncer Infiltrante de Glándula Mamaria Cancerología 2008; 3: 7-17.

15.- Manuales de uso Image-pro Plus.
<http://www.mediacy.com/index.aspx?page=ProductNotes>