

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Relación entre niveles de expresión de HPGD con la
densidad y el fenotipo de linfocitos T en tejido tumoral
de pacientes con cáncer de próstata y su asociación con
recurrencia bioquímica**

Sergio Fabián Rodríguez Castañeda

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología, Maestría en Inmunología
Bogotá, Colombia

2022

**Relación entre niveles de expresión de HPGD con la
densidad y el fenotipo de linfocitos T en tejido tumoral
de pacientes con cáncer de próstata y su asociación con
recurrencia bioquímica**

Sergio Fabián Rodríguez Castañeda

Tesis presentada como requisito para optar al título de:
Magister en Inmunología

Directora:

Alba Lucía Combita Rojas, M.Sc., Ph.D.

Codirector:

Rafael Santiago Parra Medina, M.D., Ph.D.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología, Maestría en Inmunología
Bogotá, Colombia
2022

*A todos los que han sido partícipes
de mi formación no sólo académica
sino también personal y por brindarme
su valioso apoyo*

*Según vamos adquiriendo conocimiento, las
cosas no se hacen más comprensibles, sino
más misteriosas*

Albert Schweitzer

Declaración de obra original

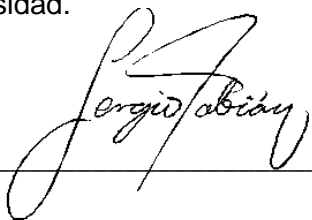
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Sergio Fabián Rodríguez Castañeda

Fecha 15/03/2022

Agradecimientos

A mi familia, Doris Castañeda Sastoque, Jorge Elías Rodríguez Hernández y Doris Juliana Rodríguez Castañeda por su amor incondicional y acompañamiento en cada uno de mis procesos de vida.

A los profesores Alba Lucía Combata Rojas M.Sc, PhD y Rafael Parra Medina MD, M.Sc, PhD, por la dirección de este proyecto, por su grandiosa colaboración y siempre disposición de enseñanza.

A la profesora Myriam Lucía Navarrete Jiménez M.Sc y a Ruth Myriam Molina Lizcano por el apoyo constante en todos los procesos académicos y administrativos de este programa de postgrado.

A Nathaly Poveda Garavito, por su valiosa amistad, por su compañía día a día en este proceso académico y su valioso apoyo emocional en esta etapa de vida.

A Carolina María Vargas León M.Sc, por su invaluable asesoría esta nueva área de trabajo, la investigación; por su amistad y por compartirme su genialidad académica.

A Hedda Michelle Guevara Nieto M.Sc y Dayanne Rodríguez Hernández M.Sc, por la asesoría y ayuda en el laboratorio; y por brindarme su amistad en este proceso.

A Luli Yojana González Castañeda, por su constante colaboración en la resolución de los múltiples inconvenientes administrativos; por su enorme amabilidad y empeño de cooperación permanente en el proceso de histotecnología, y junto con July Pauline Castro Delgado y Sindy Paola Sáenz Casallas por su colaboración y diligencia en los procesos de laboratorio de patología.

A Jorge Mesa MD y Maribel Palencia Palacios MD, M.Sc por su amable cooperación en el desarrollo del componente de laboratorio de patología de este proyecto.

VI

A Wendy Johana Montero Ovalle M.Sc y Laura Rey Vargas M.Sc, por la asesoría amable que siempre me brindaron en el laboratorio.

A las instituciones:

Instituto Nacional de Cancerología E.S.E. a través de su departamento Grupo de Investigación en Biología de Cáncer y su dependencia Patología Oncológica en donde se realizó este estudio

A la Maestría en Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, por su apoyo académico y económico.

Y a la Universidad Nacional de Colombia, por contribuir en mi construcción no sólo académica, sino social y personal; y por generarme el orgullo de pertenecer a una Institución del Estado que desde su creación siempre ha tenido el objetivo de mejorar el tejido social de nuestro país.

Financiación

Esta investigación fue financiada por el Instituto Nacional de Cancerología, mediante el proyecto titulado: "Caracterización de perfiles de expresión génica en los grupos de riesgo de recurrencia bioquímica en adenocarcinoma de próstata", código de proyecto: C19010300456. Adicionalmente, se contó con el apoyo económico de la Maestría en Inmunología del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional de Colombia.

Resumen

En este proyecto se planteó determinar la relación entre los niveles de expresión de 15-Hidroxi prostaglandina deshidrogenasa (HPGD) con la densidad y el fenotipo de linfocitos T (LT) en tejido prostático de pacientes con cáncer de próstata (CaP) y su posible asociación con la recurrencia bioquímica (RB).

Es un estudio analítico retrospectivo, en tejidos incluidos en parafina de pacientes con CaP tratados en el Instituto Nacional de Cancerología (INC) entre los años 2007 a 2013, intervenidos con prostatectomía radical (PR). Se analizó la expresión de *HPGD* mediante qRT-PCR e inmunohistoquímica. La población y fenotipo de LT (periféricos e infiltrantes de tumor (TIL)) se determinó mediante inmunohistoquímica a través de la utilización de anticuerpos específicos para cada marcador. Pruebas de χ^2 o test exacto de Fisher fueron aplicadas para determinar diferencias estadísticamente significativas entre las variables analizadas con una $p < 0,05$.

Se observó una expresión positiva de HPGD en todos los casos, sin embargo, esta expresión fue de bajo nivel en la mayoría. Adicional, no se encontraron diferencias significativas con respecto a los desenlaces de RB ni los grupos grado Gleason ($p > 0,05$). La expresión proteica de HPGD en tejido prostático no tumoral se encontró en alta frecuencia a bajo nivel mientras que, en tejido tumoral se halló una baja frecuencia y bajo nivel ($p < 0,001$). La infiltración de LT se presentó en mayor densidad en la región tumoral vs periférica ($p < 0,001$). La densidad alta de TIL se asoció a mayor infiltración CD4 que CD8 y ambos casos se relacionaron con un riesgo de desarrollo de RB ($P < 0,05$). La razón CD8/CD4 se presentó principalmente en mayor frecuencia en tejido periférico de pacientes sin RB. Por otro lado, la expresión alta de HPGD se encontró casi exclusivamente en tejido

tumoral en un número reducido de casos y en estos se relacionó con una tendencia de expresión negativa de ERG y sin RB.

Aunque no se pudo establecer una asociación entre la densidad ni la razón TIL CD4/CD8 con los niveles de expresión de HPGD y los desenlaces de RB, nuestros resultados resaltan los hallazgos de que la expresión de ERG podría desregular la expresión de HPGD y esta baja expresión podría explicar la baja actividad de los TIL explicando las características de un tumor frío inmunológicamente. Sin embargo, es necesario realizar otros ensayos que permita establecer un mejor fenotipo de las poblaciones celulares y en un número poblacional mayor.

Palabras clave: Cáncer de Próstata, Infiltración Linfocitaria, Recurrencia Bioquímica, Microambiente tumoral, Inmunorregulación

Relationship between HPGD expression levels with the density and phenotype of T lymphocytes in tumor tissue of patients with prostate cancer and its association with biochemical recurrence

Abstract

This project aimed to determine the relationship between the expression levels of 15-Hydroxyprostaglandine dehydrogenase (HPGD) with the density and phenotype of T lymphocytes (Tcell) in prostatic tissue from patients with prostate cancer (PCa) and its possible association with biochemical recurrence (BCR).

It is a retrospective analytical study, in paraffin-embedded tissues of patients with PCa treated at the National Cancer Institute (INC) between 2007 and 2013, who underwent radical prostatectomy (PR). HPGD expression was analyzed by qRT-PCR and immunohistochemistry. The population and phenotype of LT (peripheral and tumor infiltrating (TIL)) was determined by immunohistochemistry through the use of specific antibodies for each marker. χ^2 tests or Fisher's exact test were applied to determine statistically significant differences between the variables analyzed with a $p < 0.05$.

Positive expression of HPGD was observed in all cases, however this expression was low level in the majority. Additionally, no significant differences were found regarding the outcomes of BR or the Gleason grade groups ($p > 0.05$). The protein expression of HPGD in non-tumorous prostate tissue was found in high frequency at a low level, while in tumor tissue a low frequency and low level was found ($p < 0.001$). LT infiltration was found to be more dense in the tumor vs. peripheral region ($p < 0.001$). High TIL density was associated with greater CD4 than CD8 infiltration, and both cases were associated with a risk of BR development ($P < 0.05$). The CD8/CD4 ratio was mainly present in higher frequency in

peripheral tissue of patients without BR. On the other hand, the high expression of HPGD was found almost exclusively in tumor tissue in a small number of cases and in these it was related to a trend of negative expression of ERG and without RB.

Although an association between density and TIL CD4/CD8 ratio with HPGD expression levels and RB outcomes could not be established, our results highlight the findings that ERG expression could dysregulate HPGD expression and this low expression could explain the low activity of TILs, explaining the characteristics of an immunologically cold tumor. However, it is necessary to carry out other tests that allow establishing a better phenotype of the cell populations and in a larger population number.

Keywords: Prostate Cancer, Lymphocytic Infiltration, Biochemical Recurrence, Tumor Microenvironment, Immunoregulation

Contenido

1. Problema de Investigación.....	3
2. Objetivos	5
2.1. Objetivo General.....	5
2.2. Objetivos específicos	5
3. Marco teórico	6
3.1. Generalidades del cáncer de próstata.....	6
3.2. Anatomía de la Próstata.....	6
3.3. Mecanismos patológicos en CaP	7
3.4. Historia Natural de la Enfermedad (Progresión)	8
3.5. Diagnóstico de CaP	9
3.6. Tratamiento.....	9
3.6.1 Enfermedad localizada.....	9
3.6.2 Enfermedad avanzada	9
3.7. Recurrencia bioquímica	10
3.8. Microambiente tumoral e inmunovigilancia.....	10
3.9. Infiltración leucocitaria e inflamación.....	12
3.10. Panorama de las células inmunológicas infiltrantes de tumores prostáticos. .	13
3.11. Alteraciones de las poblaciones de células inmunitarias de la próstata durante la progresión del cáncer.	14
3.12. HPGD.....	15
4. Metodología.....	17
4.1. Consideraciones éticas:.....	17
4.2. Diseño del estudio:	18
4.3. Población de estudio.....	18
4.4. Información clínica de los pacientes:.....	18
4.5. Tipo de Muestra	19
4.6. Tamaño de la Muestra	19
4.7. Criterios de inclusión.....	19
4.8. Criterios de exclusión:.....	19
4.9. Selección de tejido.....	20
5. Procedimientos.....	21
5.1. Procedimientos para el primer objetivo específico, determinar los niveles de expresión génica y proteica de HPGD en tejido tumoral de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata localmente/regionalmente avanzado y correlacionarlos con la recurrencia bioquímica y los GGG 1-5.....	21
5.1.1. Análisis de expresión génica de <i>HPGD</i>	21
5.1.2 Análisis de expresión proteica de HPGD por Inmunohistoquímica	24

5.2.	Procedimientos para el segundo objetivo específico, determinar la densidad y el fenotipo de los linfocitos T, infiltrativos y periféricos del tumor, en tejido prostático de pacientes con cáncer de próstata localmente/regionalmente avanzado y su correlación con la recurrencia bioquímica y los GGG 1-5.....	25
5.3.	Procedimientos para el tercer objetivo específico, correlación de los niveles de expresión de HPGD de acuerdo con la densidad y el fenotipo de LT en los desenlaces de RB 26	
5.4.	Análisis In silico de expresión de RNA	27
5.4.1.	Recolección de datos	27
5.4.2.	Preprocesamiento de datos.....	27
5.4.3.	Análisis de poblaciones leucocitarias en pacientes con CaP	27
5.4.4.	Identificación de genes expresados diferencialmente.....	28
6.	Resultados.....	29
6.1.	Características clínico-patológicas	29
6.2.	Análisis de la expresión génica y proteica de HPGD según RB y GGG.....	32
6.2.1	Análisis de expresión de HPGD por PCR en tiempo real según recurrencia bioquímica y GGG.....	32
6.2.2	Análisis de expresión proteica de HPGD por inmunohistoquímica según RB, región tisular y GGG.....	33
6.3.	Análisis del inmunofenotipo y la densidad linfocitaria según región tisular, RB y GGG. 37	
6.4.	Correlación de los niveles de expresión de HPGD de acuerdo con el fenotipo y densidad de LT en casos RB y GGG.	42
6.5.	Análisis in Silico	43
6.5.1.	Análisis de poblaciones leucocitarias en pacientes con CaP	43
6.5.2	Análisis transcriptómico en CaP	44
7.	Discusión.....	48
8.	Conclusiones.....	54
9.	Recomendaciones.....	55

Lista de figuras

Figura 3-1: Papel inmunosupresivo de la PGE2 en el MAT. Figura tomada de la referencia [121].....	16
Figura 6-1: Expresión de <i>HPGD</i> según región tisular (A) recurrencia bioquímica (B) y Grupo Grado Gleason (C).....	33
Figura 6-2: Expresión de proteína <i>HPGD</i> como positivo o negativo según región tisular (A) y nivel de expresión en alto, medio, bajo o negativo según región tisular (B).....	34
Figura 6-3: Expresión de proteína <i>HPGD</i> según región tisular y según desenlace de RB (A y B) y nivel de expresión según tisular y desenlace de RB (C y D).....	35
Figura 6-4: Niveles de expresión de proteína <i>HPGD</i> según desenlace de RB y riesgo definido por GGG.....	36
Figura 6-5: Nivel de expresión de CD4 según región tisular (A). Nivel de expresión de CD8 según región tisular (B). Relación de CD4/CD8 según región tisular (C). Expresión de Granzima B según región tisular (D). Expresión de CD20 según región tisular (E). Infiltración linfocitaria CD4 en rojo y CD8 en café (F). Infiltración de LB (G). (*niveles de significancia $p < 0.05$).....	38
Figura 6-6: Niveles de expresión de CD4 y CD8 (LT) según el desenlace de RB y región tisular (A y B). Kaplan Meier de supervivencia libre de RB según la densidad de TIL CD4 (C) y TIL CD8 (D). (*niveles de significancia $p < 0.05$).....	39
Figura 6-7: Relación de CD4/CD8 según el desenlace de RB y región tisular (*niveles de significancia $p < 0.05$).....	40
Figura 6-8: Nivel de expresión de CD8 en el contexto de CD4/CD8 y alta expresión de CD4 intratumoral en paciente con RB y sin RB (*niveles de significancia $p < 0.05$).....	41
Figura 6-9: Relación de CD4/CD8 en todas las regiones tisulares según desenlace de RB y riesgo determinado por GGG. Pacientes con RB (A) y pacientes sin RB (B). (*niveles de significancia $p < 0.05$).....	42
Figura 6-10: Mapa de calor no supervisado de DEG en muestras tumorales de la base datos de TCGA. (Imagen desarrollada con XCell).....	43
Figura 6-11: Mapa de calor no supervisado de DEG en muestras tumorales y no tumorales de la base datos de TCGA.	46
Figura 7-1: Niveles de expresión de ERG y <i>HPGD</i> ; e infiltración y relación CD4/CD8 según la región tisular y los desenlaces de RB (imagen desarrollada en BioRender.com).....	53

Lista de tablas

Tabla 5-1: Genes y sondas incluidos en los ensayos de qRT-PCR.....	24
Tabla 6-1: Características clínicas en pacientes con diagnóstico de CaP (N = 98).	30
Tabla 6-2: Características clínicas en pacientes con diagnóstico de CaP, teniendo en consideración la RB (N = 98).....	31
Tabla 6-3: Correlación de los niveles de expresión de HPGD de acuerdo con el fenotipo y densidad de LT en casos RB y Gleason. Análisis descriptivo de 6 casos.....	42
Tabla 6-4: DEG de muestras tumorales vs no tumorales según desenlace de RB y niveles de expresión de <i>HPGD</i> de pacientes de la base de datos del INC.	47

Lista de abreviaturas

CaP: Cáncer de próstata

CRPC: Cáncer de próstata resistente a la castración.

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ERG: Erythroblast Transformation-Specific Transcription Factor ERG

FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

GGG: Grupo grado Gleason

HPGD: 15-Hidroprostaglandina deshidrogenasa

INC: Instituto Nacional de Cancerología

LT: Linfocitos T.

MAT: Microambiente tumoral

MEC: Matriz extracelular

PR: Prostatectomía radical

PSA: Antígeno prostático específico.

RA: Receptor de andrógenos

RB: Recurrencia bioquímica

RNA: Ácido ribonucleico

TCGA: The Cancer Genome Atlas Research Network

TIL: Linfocitos infiltrantes de tumor

Introducción

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda causa de cáncer más frecuentemente diagnosticada en el mundo en hombres y la quinta causa de muerte por cáncer. De acuerdo con datos de Globocan, en el 2020 se diagnosticaron aproximadamente 1.41 millones de nuevos casos, lo que representa el 15% del total de los cánceres. [1]. En Colombia, es el cáncer más incidente y el segundo en mortalidad, con un 27.4% de la incidencia del total de cánceres en hombres y con una tasa de mortalidad ajustada por edad de 11,9 por 100.000 hombres[2].

El CaP suele ser asintomático en estadios tempranos y a menudo tener un curso indolente [3][4]. Los pacientes diagnosticados con CaP localizado son intervenidos mediante tratamientos de intención curativa como lo son la cirugía de prostatectomía radical (PR) o la radioterapia (RT) [5][6]. Alrededor de un tercio de los pacientes a los que se les realiza PR, presentan posteriormente aumento en los niveles de antígeno prostático específico (PSA) por encima de 0.2 ng/ml, lo que se denomina recurrencia bioquímica (RB), y está relacionada con la presencia y/o progresión hacia formas y estadios tumorales más avanzados y agresivos que llevan a un peor pronóstico y pobre supervivencia [7][8]. Por lo tanto, el seguimiento de estos pacientes con vigilancia continua para RB se ha convertido en una evaluación crítica para evitar el avance tumoral.

Actualmente, se han desarrollado varios nomogramas para estimar la agresividad del CaP después de la biopsia, como los criterios D'Amico, dentro de los parámetros diagnósticos para predecir el riesgo de RB en la fase preoperatoria están el patrón de Gleason de la biopsia, los niveles iniciales de PSA y el estadio clínico (cT) [9][10]; y en la fase postoperatoria se cuenta adicionalmente con el estadio patológico (pT), el grado de Gleason del tejido, compromiso de los nódulos linfáticos, compromiso del borde y la

2

presencia de metástasis a distancia [11][12][13]. Aunque estos parámetros son útiles para generar un pronóstico, no son muy específicos y no permiten establecer con certeza los pacientes que podrían tener recurrencia.

Con el fin de buscar posibles alternativas que establezcan el riesgo del desarrollo de RB, numerosos estudios han establecido la relación entre la expresión diferencial de ciertos genes con el riesgo de RB [14][15][16][17]. Recientemente, en el Grupo de Investigación en Biología del Cáncer del INC, con el fin de identificar posibles patrones de expresión génica diferencial asociados a riesgo de RB en pacientes colombianos con CaP local/regionalmente avanzado, se identificó que la sobreexpresión del gen 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa (*HPGD*) se asoció a un mayor riesgo de RB dentro de los 5 años posteriores a la PR. Este gen está implicado en el metabolismo de las prostaglandinas por lo que alteraciones en él pueden generar cambios en las vías inflamatorias [18] y a su vez condicionar el microambiente tumoral (MAT).

El MAT se genera a partir de la interacción entre las células tumorales y las del estroma peritumoral; y es un determinante crítico en la carcinogénesis porque permite la progresión local del tumor hasta el desarrollo de metástasis[19]. El MAT al ser un tejido alterado, genera alerta al sistema inmunológico y cuando células de este sistema reconocen e invaden el MAT se genera el denominado tejido inmunológico asociado a tumor (TIAT), el cual puede ser modificado hacia un perfil inmunotolerante por el contacto estrecho con factores secretados por el MAT [20]. Dentro de este TIAT se hallan los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL, por sus siglas en inglés) los cuales también pueden presentar líneas alteradas (inmunotolerantes), como los LT CD4+ CD25+, que en un estudio se halló que ocupaban hasta el 70% de la población TIL en CaP lo que se asociaba a pobre respuesta terapéutica y peor pronóstico [21]; y otro estudio evaluó la línea de LT reguladores (Treg), que se caracteriza por la expresión del marcador FOXP3 y en estos se encontró especialmente asociado una alta expresión del gen *HPGD* [22].

1. Problema de Investigación

Durante el seguimiento postquirúrgico a pacientes a los que se les realizó PR, la RB es una variable que de forma directa está indicando la reaparición de focos tumorales o metástasis, que son productos de siembras de células tumorales que han podido evadir la inmunovigilancia por parte del huésped [7][8][23].

Por amplia evidencia se sabe que las células tumorales pueden escapar de la vigilancia y destrucción inmunológica mediante varios mecanismos que implican la expresión de genes y productos inmunológicos, lo que altera su entorno y genera un MAT que subsecuentemente afecta la manera en que se interacciona con las células del sistema inmune [24][25]. La presencia de TILs en muestras tumorales se ha asociado a un pronóstico favorable en diversos tipos de cáncer [26]. Sin embargo, en CaP, una alta densidad de TILs se asocia a peor pronóstico debido en parte a la presencia de LT inmunosupresivos [21][27][28]. Algunos estudios han asociado la presencia abundante de TIL CD8+ en CaP con tiempos más cortos de supervivencia libre de RB [29][30], y al evaluar la expresión de otros marcadores de superficie celular en TIL CD8+ como CD73, PD-L1 y FOXP3, los cuales pueden modificar su fenotipo, se han asociado con peores resultados clínicos [21][28].

De igual forma, la expresión de ciertas moléculas en la matriz extracelular puede no solo modificar el fenotipo sino también afectar la infiltración tumoral de los LT [31], como en el caso de TGF- β o IL-10 [32][33], que inhiben la función de los LT efectores una vez que estos entran en contacto con el MAT [33] (23); y como en el caso de la expresión alterada de la quimioquina CCL2 en CaP y colon, la cual inhibe la infiltración tumoral por parte de los LT efectores y reteniéndolos en el estroma [34].

4

Los linfocitos T reguladores (Treg) son importantes para prevenir la autoinmunidad y mantener la homeostasis tisular. Estas células expresan altos niveles de la enzima *HPGD*, cuya expresión es requerida en la vía de señalización de la IL-2 y la expresión de FOXP3 [22]. Se ha documentado que la baja expresión génica de *HPGD* se relaciona con mayor riesgo de desarrollo de algunos tipos de cáncer [35][36][37], sin embargo en CaP la sobreexpresión de este gen se ha encontrado en estadios patológicos más avanzados [38] así como en la línea celular tumoral, LNCaP sensible a andrógenos, que sobreexpresa el receptor de andrógenos (RA) [39]. Esta línea de CaP, en un estudio mostró que tiene mayor actividad de *HPGD* con la estimulación de andrógenos, sin embargo no se especifica la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* en este estudio [40]. Estos resultados sugieren que los andrógenos a través de sus receptores inducen la expresión del gen *HPGD* por medio de una vía no convencional y no genómica [41][42]. Por otro lado, en estudios previos se ha evidenciado que el knockdown de *ERG* resulta en la sobreexpresión de *HPGD* y la subsecuente inhibición del crecimiento celular por la PGE₂, sugiriendo el papel de la oncoproteína *ERG* en la inflamación y la tumorigénesis del CaP [43].

Dado que la sobreexpresión del gen *HPGD* se ha relacionado con estadios patológicos más avanzados de CaP, en este estudio se plantea la pregunta: ¿existe una relación entre los niveles de expresión de *HPGD* con el fenotipo de LT presentes en muestras tumorales que pueda explicar el riesgo de desarrollo de RB en CaP?

En este contexto, se plantea la hipótesis de una posible relación entre: los niveles de expresión de *HPGD* y la densidad de fenotipos específicos de LT asociados a un microambiente inmunosupresivo, que explique este comportamiento adverso de la presencia de TIL con un mal pronóstico en pacientes con CaP. La identificación y posible correlación de fenotipos linfocitarios específicos asociados a esta expresión diferencial de *HPGD* podría conllevar a la suma de más parámetros que aporten a una mejor aproximación del pronóstico de RB en los pacientes, y a su vez podría brindar más herramientas al personal clínico para control, seguimiento y realización de posibles intervenciones inmunoterapéuticas más tempranas en este grupo poblacional

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Determinar la relación entre los niveles de expresión génica y proteica de *HPGD* con la densidad y el fenotipo de linfocitos T en tejido prostático de pacientes con cáncer de próstata y su asociación con recurrencia bioquímica.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar los niveles de expresión génica y proteica de *HPGD* en tejido tumoral de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata localmente/regionalmente avanzado y correlacionarlos con la recurrencia bioquímica y los Grupos Grado Gleason 1-5.
2. Determinar la densidad y el fenotipo de los linfocitos T, infiltrativos y periféricos del tumor, en tejido prostático de pacientes con cáncer de próstata localmente/regionalmente avanzado y su correlación con la recurrencia bioquímica y los Grupos Grado Gleason 1-5.
3. Correlacionar los niveles de expresión de *HPGD* de acuerdo con la densidad y el fenotipo de Linfocitos T en los desenlaces de recurrencia bioquímica.

3. Marco teórico

3.1. Generalidades del cáncer de próstata

El CaP es el segundo tipo de cáncer con mayor incidencia y una de las mayores causas de muerte por cáncer en hombres en todo el mundo [44]. De acuerdo con datos de Globocan, para el 2018 la incidencia estimada estandarizada por edad fue de 29.3 casos por 100000 hombres, mientras que la mortalidad estimada estandarizada por edad fue de 7.6 casos por 100000 hombres [45]. En Colombia, el CaP ocupa el primer lugar en incidencia, con una tasa estimada de 55.9 casos por cada 100.000 hombres, lo que representa un número estimado de nuevos casos de 12.712 por año y la edad promedio de diagnóstico es de 71 años [46]. La tasa estimada de mortalidad es de 14.1 casos por cada 100.0000 hombres, hecho que lo constituye en un problema importante de salud pública. Estudios en Norteamérica demuestran que las tasas de incidencia son más altas en afrodescendientes comparados con caucásicos, con una mayor agresividad y una mortalidad que casi dobla la de otras poblaciones [47][48][49]. Se estima que aproximadamente el 60% de los CaP se asocian a factores ambientales o de estilo de vida como fumar, baja actividad física y dieta con alto contenido de grasas; y comorbilidades como hipertensión arterial y obesidad incrementan el riesgo tanto de incidencia como de agresividad [50][51][52][53][54][55]. El 40% de los casos de CaP se debe a factores genéticos hereditarios, se ha establecido que la historia familiar de CaP en hombres con padre o hermanos con este diagnóstico tienen un doble riesgo de padecerlo [56][57].

3.2. Anatomía de la Próstata

La próstata humana es la glándula masculina accesoria más grande, es el órgano de origen para las dos enfermedades más prevalentes en hombres mayores: la hiperplasia prostática benigna (HPB) y el CaP, y aunque ocurran en la misma población, son enfermedades no relacionadas [58]. Anatómicamente, la próstata se divide en tres zonas: transicional, central y periférica; en esta última zona es más frecuente el carcinoma, la prostatitis crónica y la atrofia post-inflamatoria, mientras que en la zona transicional está más involucrada con el diagnóstico de HPB y menos común el adenocarcinoma. El adenocarcinoma llega a ser

cerca del 95% de las neoplasias prostáticas, frecuentemente no presenta sintomatología y su frecuencia en la zona periférica es alrededor del 70% [59].

3.3. Mecanismos patológicos en CaP

El panorama genético del CaP se ha explorado ampliamente en los últimos años con la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) mediante análisis del genoma completo, transcriptoma y de las alteraciones epigenéticas. Dentro de los hallazgos se pueden nombrar:

- Una tasa relativamente baja de mutaciones en comparación con otros tumores.
- Prevalencia de variaciones no aleatorias del número de copias (CNV) en la mayoría de los tumores que involucran oncogenes prostáticos o supresores tumorales conocidos.
- Reordenamientos cromosómicos que involucran los factores de transcripción ETS (por sus siglas en inglés Erythroblast Transformation Specific), con mayor frecuencia el oncogen *ERG* (ETS-related gene) en el 60% a 70% de CaP, que sitúa a estas proteínas bajo el control de un promotor dependiente de andrógenos.
- Fuerte implicación de las vías de desarrollo que gobiernan el desarrollo embrionario de la próstata en el inicio y particularmente la progresión a CaP resistente a castración (CPRC).
- Las alteraciones a gran escala en los programas transcripcionales, en particular los regulados por el RA, y su papel destacado en la conducción de reordenamientos de DNA y la cooptación de vías de desarrollo [60].

Las alteraciones genómicas conocidas más comunes en CaP involucran cuatro vías y genes: la vía del RA, la vía PI3K, los reordenamientos que colocan a los miembros de la familia de los factores de transcripción ETS bajo el control del promotor de *TMPRSS2* sensible a los andrógenos y la pérdida de la función del supresor tumoral de próstata *NKX3*.

La fusión génica *TMPRSS2-ERG* (Serina proteasa transmembrana 2 - gen relacionado con ETS), es causada por deleción o translocación, ocurre en cerca del 60% de los casos de CaP [15], y favorece la expresión de la oncoproteína *ERG* truncada bajo el control del

promotor de *TMPRSS2*, el cual posee elementos de respuesta al RA [61]. Las fusiones parecen ser un evento temprano, que ya se encuentra en las neoplasias intraepiteliales prostáticas (NIP) [62], y se cree que la presencia de fusión *TMPRSS2-ERG* es suficiente para el inicio de las NIP [16].

3.4. Historia Natural de la Enfermedad (Progresión)

El gen del RA, perteneciente a la superfamilia de genes receptores de hormonas esteroideas [63], es un factor de transcripción que regula la vía de señalización clásica dependiente de andrógenos. Una vez ingresa la testosterona a la célula, esta es rápidamente convertida a dihidrotestosterona (DHT), la cual es un metabolito activo con una mayor afinidad por el receptor que la testosterona [64][65]. La unión de alguna de las dos hormonas al RA conduce a la homodimerización del receptor, que luego se transloca al núcleo, en donde se une a los elementos de respuesta a andrógenos dentro de las regiones promotoras o enhancer de los genes blanco, activando la transcripción [65].

En CaP, la vía de señalización clásica del RA se encuentra sobrerregulada, por lo que constituye el principal blanco terapéutico a través de la inhibición de las hormonas androgénicas activadoras [66]. Sin embargo, durante la progresión del CaP, el RA pasa a ser sobre regulado por otros mecanismos independientes del estímulo androgénico, como son: i) mutaciones somáticas en el dominio dependiente de ligando o por amplificación del gen del RA, presentes en el 60% de los casos resistentes, que le confieren la facultad de responder a otras hormonas e incluso a fármacos anti-androgénicos [65][67][68][69]. ii) Alteraciones en las interacciones con proteínas coactivadoras que podrían permitirle al RA responder a andrógenos adrenales, otras hormonas o anti-andrógenos [66]. iii) Activación constitutiva de proteínas reguladoras corriente abajo del RA [65][70]. iv) Alteraciones en la expresión y/o función de genes y vías de señalización que conducen a la activación del RA, descritas anteriormente, como son la vía PI3K-AKT y MAPK activadas por EGF e IGF-1, y la vía JAK-STAT activada por IL-6 e IL-8 [71][72][73][74][75]. Estas últimas involucradas en procesos de supervivencia, proliferación celular y progresión del CaP.

3.5. Diagnóstico de CaP

El diagnóstico actual de CaP involucra la realización de dos pruebas de tamización: la medición de PSA y el tacto rectal. Subsecuentemente mediante biopsias se confirma el diagnóstico de CaP y la estadificación histopatológica [76]. Con la biopsia se establece el puntaje de Gleason, el cual determina el grado de diferenciación del tumor (1-5, en donde 1 es el patrón más diferenciado y 5 el menos diferenciado) [77].

3.6. Tratamiento

3.6.1 Enfermedad localizada

Prostatectomía Radical (PR): Junto con la Radioterapia son considerados como procedimientos de intención curativa. Está principalmente indicado en pacientes con diagnóstico de carcinoma localmente avanzado. La PR y la linfadenectomía pélvica son los tipos quirúrgicos más aplicados en CaP [78].

Radioterapia: Después de la PR, las radioterapias se consideran como la segunda modalidad terapéutica de intención curativa más utilizadas para los casos de CaP localmente avanzado de alto riesgo. Existen dos formas de entrega, la braquiterapia y la radioterapia de haz externo, pudiéndose utilizar la braquiterapia como monoterapia [79].

3.6.2 Enfermedad avanzada

En los casos diagnosticados con enfermedad avanzada/metastásica, el tratamiento consiste en la terapia de supresión de andrógenos (quirúrgica u hormonal), o radioterapia con o sin tratamiento hormonal, o cuidados paliativos. En caso de presentarse una recaída de la enfermedad posterior al tratamiento con intención curativa (bioquímica o evidenciada por la aparición de tumores), se somete a los pacientes a tratamiento hormonal (orquidectomía o antiandrógenos). Si la regresión del tumor es persistente, este

tipo tumoral se ha denominado CaP resistente a castración u hormonorefractario, y su fenotipo resistente es atribuido principalmente a la señalización aberrante del RA. Por lo tanto, estos tumores no responden a las terapias antiandrogénicas y su supervivencia es muy pobre [64][80][81].

3.7. Recurrencia bioquímica

La RB en pacientes con tratamiento de PR está definida como el aumento de PSA mayor a 0.2 ng/mL, con una segunda medición confirmatoria. El PSA sérico después de la PR debe descender hasta niveles indetectables, teniendo en cuenta que la vida media de este PSA post-PR es de 2 a 3 días [82]. Algunas características clínicas pueden ayudar a diferenciar el tipo de recurrencia, por ejemplo la falla del PSA dentro de los 6 primeros meses sugiere la presencia de enfermedad metastásica, mientras que los pacientes que presenten márgenes quirúrgicos positivos tienen más probabilidades de tener una enfermedad local recurrente [83][84].

3.8. Microambiente tumoral e inmunovigilancia

El crecimiento tumoral no proviene únicamente de las células cancerígenas, sino que también depende de las interacciones entre las células epiteliales cancerígenas y el compartimento estromal de alrededor con el microambiente tumoral. Este compartimento se compone de múltiples células no cancerígenas como fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales y células inmunes, además de factores de crecimiento, quimioquinas, citoquinas, matriz extracelular (MEC) y enzimas de degradación de la MEC [19]. La intercomunicación entre las células epiteliales y este compartimento puede conllevar a la remodelación de la MEC y potenciar la metástasis, con la liberación de factores solubles necesarios para la expansión tumoral.

La expresión de los RA no se limita a las células epiteliales, sino que también es abundante en el estroma prostático normal, siendo el músculo liso el tipo celular estromal que los expresa más fuertemente [85]. Esta expresión normal de las señales que se generan de ambas partes (tanto las células epiteliales como del estroma) mantiene la homeostasis

orgánica [86]. Las alteraciones celulares también comprometen al estroma, en el que se produce un cambio del dominio del tipo celular de músculo liso hacia a miofibroblastos [85] lo que altera la expresión de los RA y a su vez la composición del microambiente que influye en el desarrollo del CaP [87].

En el CaP, las células del estroma muestran una alteración fenotípica en la que hay una mayor remodelación de la MEC, aumento de la actividad proteasa, aumento de la angiogénesis y una afluencia de células inflamatorias[86]. Los cambios que ocurren en el estroma adyacente al tumor se denominan respuesta desmoplástica o “estroma reactivo”[88]. Dentro de estas alteraciones se hallan los fibroblastos que adquieren características de células de músculo liso, transformándose en miofibroblastos; estos que en condiciones normales participan en la formación del tejido granular durante el proceso de cicatrización, cumplen una función patológica dentro de un contexto tumoral, promoviendo la reactividad estromal y la proliferación tumoral [89][90]. La presencia de miofibroblastos alrededor de diferentes focos tumorales epiteliales sugiere su participación en la tumorigénesis inicial, como se evidencia en muestras tisulares de CaP, al ser detectados alrededor de las lesiones premalignas de NIP, con un aumento en su actividad y número a medida que progresa el grado tumoral [91].

Estudios experimentales demuestran esta participación de los miofibroblastos asociados a tumor (también conocidos como fibroblastos asociados a cáncer, CAFs) en la tumorigénesis como una fuente de señales potencializadoras malignas [92]. Sus efectos en la progresión tumoral inician con la remodelación de la MEC, mediante producción de factores solubles críticos asociados al tejido, que al ser liberados son tomados como señales de daño por parte del sistema inmune, lo cual genera el reclutamiento de células inflamatorias infiltrativas. La liberación de señales por parte de los miofibroblastos está potencializada a su vez por la neovascularización tumoral (angiogénesis). Finalmente, la prolongada intercomunicación entre las células tumorales y su microambiente adyacente con el infiltrado inmunológico conlleva al desarrollo de la tolerancia inmune al tumor [90].

3.9. Infiltración leucocitaria e inflamación

Se ha establecido muy bien que los tumores son antigénicos y pueden inducir una respuesta inmunológica, debido en parte a la producción de proteínas alteradas [93]. Dentro de los tipos de células inmunitarias asociadas a tumores incluyen células inmunitarias innatas (monocitos, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células dendríticas, células asesinas naturales y otras), células inmunitarias adaptativas (células T y células B) y células inmunosupresoras (como células T reguladoras, células B reguladoras y células supresoras derivadas de mieloides). En algunos casos, las células inmunitarias asociadas a tumores participan en la vigilancia inmunitaria y en la orquestación de respuestas inmunitarias antitumorales. Se ha reconocido que la presencia de LT citotóxicos y cooperadores dentro de los márgenes tumorales ha sido asociado con un pronóstico favorable dentro de varios tipos de cáncer [24][26]. Sin embargo, la activación del sistema inmunológico y la inflamación, en particular la inflamación crónica (la cual es muy prevalente en las áreas de la próstata adulta que son propensas al desarrollo de enfermedad) puede promover la iniciación y progresión del tumor [93].

Se propone que el elevado número de células inflamatorias en el microambiente de la próstata contribuye al desarrollo del cáncer, pero los mecanismos subyacentes exactos aún no están claros. Una hipótesis es que las especies reactivas de oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno liberadas por las células inmunitarias podrían causar daños directos en el DNA e inestabilidad genética en un entorno en el que también se produce la proliferación de células epiteliales estimulada por células inmunitarias [94].

Un nuevo mecanismo molecular sobre cómo la inflamación podría ayudar a impulsar el desarrollo del CaP en células epiteliales prostáticas *in vitro* expuestas al estrés oxidativo inducido por citocinas inflamatorias, muestra que, en asociación con la señalización del RA, las células epiteliales de la próstata podrían desarrollar fusiones del gen TMPRSS2-ERG. El mecanismo preciso por el cual el estrés oxidativo puede producir estas fusiones de genes no se conocen por completo, pero se ha propuesto que la señalización de citoquinas inflamatorias (por ejemplo, la señalización del factor de necrosis tumoral (TNF) en las células epiteliales da como resultado ROS que pueden causar roturas en el DNA,

que junto con la inducción de proximidad por señalización RA, este proceso puede resultar en fusiones de genes TMPRSS2-ERG [95].

La inflamación también podría contribuir al proceso carcinogénico a través de su supuesto papel en la estimulación del desarrollo de células intermedias, que se sospecha que son células blanco para la carcinogénesis prostática que se enriquecen específicamente en áreas de atrofia inflamatoria [96].

3.10. Panorama de las células inmunológicas infiltrantes de tumores prostáticos.

Datos de varios tipos diferentes de cánceres humanos han demostrado que la distribución espacial y los tipos de células inmunitarias dentro del tumor, en el margen invasivo e incluso en estructuras linfoides terciarias tienen importancia pronóstica en términos de resultados de cáncer y pueden predecir la respuesta a la inmunoterapia[98]. Por ejemplo, se ha reportado que altas densidades de células T CD3+ , células T CD8+ citotóxicas y las células T de memoria CD45RO+ se asocian con un mejor pronóstico después de la resección quirúrgica del tumor primario en el melanoma y en el cáncer de vejiga, ovario y colorrectal[98]. De hecho, se ha sugerido la incorporación de un immunoscore en el sistema de estadificación TNM [98]. Este cambio se ha implementado particularmente en el campo del cáncer colorrectal, pero también se ha introducido para otros tipos de tumores, como el melanoma[100].

Varios estudios han examinado la importancia pronóstica de la presencia de células inmunitarias tanto innatas como adaptativas en los tumores de próstata y, curiosamente, la mayoría de estos estudios indican que la presencia de células inmunitarias, como los macrófagos asociados al tumor y las células T CD3+, confieren un mal pronóstico [101][102][103] [104][105] [106]. Combinado con el hecho de que el CaP es un tipo de tumor al que solo responde un pequeño subconjunto de pacientes a las inmunoterapias actualmente disponibles, la evidencia hasta la fecha indica que el CaP es diferente de los cánceres que se consideran inmunológicamente calientes. Varias hipótesis podrían explicar esta propiedad. En primer lugar, aunque la inflamación crónica se observa con frecuencia histológicamente, esta inflamación se presenta con mayor frecuencia en

regiones benignas de la próstata y, de hecho, la mayoría de los cánceres de próstata tienen pocas células inmunes infiltrantes de tumor. Por lo tanto, la mayoría de los cánceres de próstata parecen ser inmunológicamente "fríos". En segundo lugar, determinar la distribución espacial de células inflamatorias en un tumor de próstata puede ser un desafío debido a la multifocalidad del tumor y a que el patrón de crecimiento de invasión a menudo ocurre entre glándulas benignas. Por lo tanto, para una región específica de inflamación en la vecindad del adenocarcinoma prostático, no siempre es posible excluir que los infiltrados inflamatorios focales no estuvieran ya presentes alrededor y que involucraran glándulas benignas preexistentes[94].

3.11.Alteraciones de las poblaciones de células inmunitarias de la próstata durante la progresión del cáncer.

Numerosos tipos diferentes de células inmunitarias se han implicado en la patogenia del CaP. Por ejemplo, los macrófagos asociados a tumor se han estudiado en el contexto de la progresión del CaP[107]. De manera similar, se ha demostrado que los subtipos de células T[108][21][27][109] y las células B [110] están presentes en el microambiente del tumor de próstata y podrían contribuir a la progresión de la enfermedad. También se ha encontrado que el número de mastocitos es elevado en los tejidos de próstata cancerosos en comparación con los tejidos de próstata benignos y podría estar asociado con el pronóstico en el CaP avanzado [110].

Múltiples estudios indican que otros tipos de células inflamatorias contribuyen al desarrollo de CaP de alto riesgo. Por ejemplo, el aumento de la densidad de macrófagos asociados al tumor se correlacionó con un aumento en la puntuación de Gleason y/o confiere un mal pronóstico [101][102][103]. Además, el número de células CD3+ en las áreas tumorales y estromales fue significativamente mayor en los tumores primarios de pacientes con CaP metastásico que en los de pacientes sin metástasis[104].

Por otro lado, también se ha observado que la presencia de los TIL CD3+ se asoció significativamente con una supervivencia libre de RB más corta [26][29][30]. Adicionalmente, un número alto de TIL y una puntuación de Gleason alta [112] fueron de los predictores independientes de supervivencia libre de RB a corto plazo. En otro estudio

también se observó que un bajo número de mastocitos intratumorales se asocia con un mayor riesgo de progresión del PSA después de la PR[113].

También se ha referido que la inflamación de alto grado, en y alrededor de las glándulas malignas, se correlacionó significativamente con la RB posoperatoria[105]. Igualmente, un alto número de TIL CD4+ se asoció con un mal resultado[106]. Finalmente, los hombres con CaP que tenían inflamación del estroma tenían más probabilidades de tener enfermedad de alto grado[114].

Finalmente, diferentes subtipos de células T, como los diferentes subconjuntos de células T helper (TH) (por ejemplo, células TH1, TH2 y TH17) o células T reguladoras (Treg), también podrían ser importantes en la progresión del CaP, ya que estos subtipos pueden tener roles variados y opuestos en el microambiente tumoral [115]. Por ejemplo, las células Treg, que se caracterizan por altos niveles de expresión de CD25 y FoxP3 y se clasifican como células inmunitarias supresoras, también pueden suprimir activamente las respuestas inmunitarias antitumorales [116][20][117]. Estudios previos han demostrado que un mayor porcentaje de células T CD4+ en la próstata son células TH1, TH17 y Treg en comparación con el porcentaje que son esos fenotipos en la sangre periférica de hombres con CaP[118]. En general, la evidencia actual indica que la inflamación crónica contribuye al desarrollo del CaP y/o progresión y podría caracterizarse por diferentes niveles de diversos tipos celulares de un perfil antiinflamatorio demostrado por la presencia de linfocitos Th2, macrófagos M2, células dendríticas DC2, células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) y linfocitos Treg FOXP3+. Estas líneas favorecen el crecimiento y la expansión tumoral [97] por medio de la liberación de citoquinas inmunosupresivas como la TGF- β que es la más altamente expresada [33], y a su vez pueden alterar la función de los LT efectoras y restringirlos en la periferia tumoral, principalmente cuando hay presencia de CAFs, MDSCs y macrófagos asociados a tumor [31][112][113].

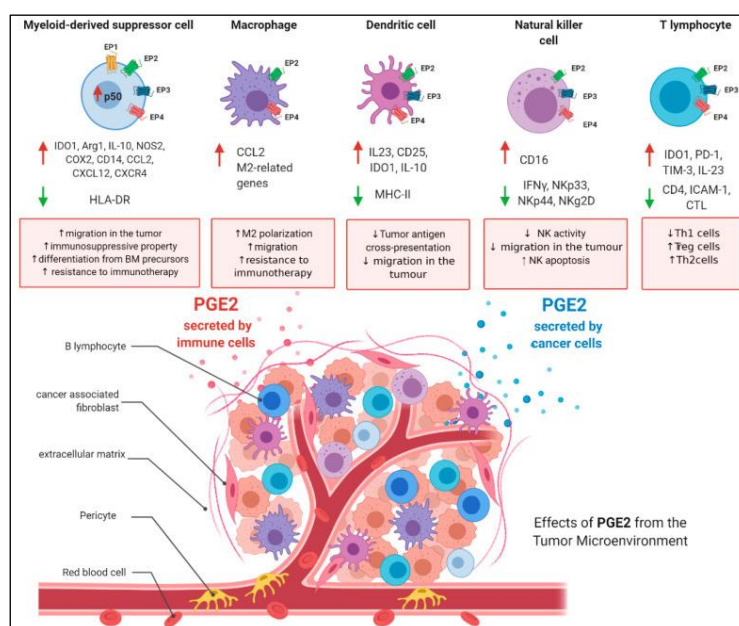
3.12. HPGD

La enzima 15-Hidroxiprostaglandina deshidrogenasa (*HPGD*) es miembro de una familia proteica de deshidrogenasas no metaloenzimáticas, que actúa dentro del metabolismo de las prostaglandinas corriente abajo del ácido araquidónico [18]. La oxigenación y ciclización del ácido araquidónico lleva a la síntesis de prostaglandina endoperoxidasa

(PGH₂, por sus siglas en inglés) catalizada por las cicloxeganasas (COX-1 y COX-2). Posteriormente, la PGH₂ es convertida en varias prostaglandinas, prostacilinas y tromboxanos a través de sintasas específicas [18]. La PGE₂ es la prostaglandina más producida por la PGE sintasa microsomal (mPGES) en células epiteliales [119]. Las prostaglandinas, prostacilinas y tromboxanos pueden ser además metabolizados por HPGD a través de la oxidación inicial del grupo 15(S)-hidroxilo, lo que conlleva a la inactivación de estos eicosanoides [18].

La PGE₂ ha sido asociada específicamente a inflamación y cáncer [120], al igual que COX-2 y las mPEGS, que se han reportado sobreexpresadas bajo estados cancerígenos e inflamatorios [121][122]. Así mismo, se ha encontrado que la pérdida o disminución de HPGD se asocia con la progresión en diversos tipos de cáncer y, junto con la sobreexpresión de COX-2, está presente en células de carcinoma invasivo de vejiga y pulmón [35]. Paradójicamente, en la línea celular de CaP sensible a andrógenos LNCaP, los andrógenos inducen la actividad de *HPGD*, pero no así en línea celular PC-3 que es andrógeno-resistente, sin embargo en la primera línea no se especifica la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* [40].

Figura 3-1: Papel inmunosupresivo de la PGE₂ en el MAT. Figura tomada de la referencia [122]



4. Metodología

4.1. Consideraciones éticas:

Este proyecto está enmarcado dentro del proyecto de investigación titulado “Caracterización de perfiles de expresión en los grupos de riesgo de RB en pacientes con adenocarcinoma de próstata”, del Grupo de Investigación en Biología del Cáncer del INC. Cuenta con la aprobación del Comité de Ética del INC, E.S.E., en su sesión del día 08 de julio de 2015. La realización del presente trabajo sigue las recomendaciones para investigar con seres humanos promulgadas por el código de Nüremberg, Declaración de Helsinki (Corea 2008) e Informe Belmont y por la legislación Colombiana Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, que establece las normas académicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. De acuerdo con esta resolución, este trabajo se considera SIN RIESGO, puesto que es un estudio retrospectivo (los bloques de parafina, la información clínica y la información de patología se obtendrá de archivos del INC-ESE) y no se les harán intervenciones a los pacientes cuyas muestras fueron incluidas.

Los procedimientos de la investigación serán efectuados por personas calificadas y competentes desde el punto de vista clínico y metodológico. La responsabilidad del estudio recae en los investigadores principales, quienes cuentan con los recursos técnicos y científicos para hacerlo competente.

El estudio igualmente se realizará ajustado a otras normas científicas, técnicas y administrativas para la Investigación en Salud establecidas por en los siguientes documentos regulatorios:

- RESOLUCION NUMERO 1995 DE 1999 (Julio 8) Por la cual se establecen normas para el manejo de la Historia Clínica
- RESOLUCION 001715 DE 2005 (junio 13) por la cual se modifica la Resolución 1995 del 8 de julio de 1999.

- Pautas Internacionales para la Evaluación Ética de los Estudios Epidemiológicos. Preparado por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS), 1991
- Resolución 3492 de 1998, Resolución 2935 del 2001 del Instituto Colombiano Agropecuario, Decisión 391 de la Comunidad Andina de Naciones. Decreto 309 del 2000 del Ministerio de Medio Ambiente.)
- BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO (BPL)

4.2. Diseño del estudio:

Es un estudio analítico retrospectivo, para la caracterización de densidad y fenotipos específicos de linfocitos infiltrantes de tumor asociados a los niveles de expresión del gen *HPGD* y al riesgo de RB.

4.3. Población de estudio

Para el estudio se obtuvieron muestras tisulares de pacientes con diagnóstico confirmado de adenocarcinoma de próstata (todos los Grupos Grado Gleason) tratados en el INC, entre los años 2007 y 2013, intervenidos con prostatectomía radical como tratamiento inicial de intención curativa.

4.4. Información clínica de los pacientes:

La información clínica se obtuvo de las historias clínicas de los pacientes incluidos en el estudio, de las bases de datos del INC. Se obtuvo información del seguimiento dentro de los 5 años posterior a la PR, con el fin de determinar la RB.

4.5. Tipo de Muestra

Muestras tisulares de prostatectomías radicales fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés) del departamento de patología del INC. Se contó con la participación de médico patólogo para el estudio y la clasificación de los tejidos.

4.6. Tamaño de la Muestra

Se incluyeron muestras de especímenes de próstata almacenadas en FFPE de pacientes diagnosticados con CaP tratados con PR en el INC. Se contó con 98 casos que cumplieron con los criterios de inclusión de los 669 casos hallados en el período comprendido entre 2007 y 2013.

4.7. Criterios de inclusión

1. Pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de próstata (grupos grado Gleason 1-5) en el INC entre 2007 y 2013.
2. Pacientes con PR como tratamiento inicial de intención curativa.
3. Pacientes con información de historia clínica.
4. Pacientes con reporte patológico de biopsia e información sobre la PR.
5. Pacientes con seguimiento y mediciones de PSA de al menos un año posterior a la PR, para determinar RB.
6. Pacientes con tejidos FFPE disponibles.

4.8. Criterios de exclusión:

1. Pacientes que no respondieron al tratamiento de PR, evidenciado con niveles de PSA mayor a 0.2 ng/mL posterior al tratamiento, por lo que no se puede determinar RB, dada la definición de RB en pacientes tratados con PR.

2. Pacientes con tratamientos adicionales después de la PR y antes de la RB o antes de culminar los 5 años de seguimiento en casos sin RB.
3. Pacientes diagnosticados con otro tipo de cáncer sincrónico y/o metacrónico.

4.9. Selección de tejido

1. Tejido prostático fijado en formol al 10% y embebido en parafina
2. Muestra que contuvieran suficiente número de bloques para poder garantizar la continuidad de seguimiento de los pacientes por parte del personal médico tratante, con el fin de no comprometer este aspecto por causa de las actividades de investigación.
3. Tejido con adenocarcinoma acinar prostático sin necrosis ni fibrosis. Para determinar la expresión génica de *HPGD*, se tomaron secciones de tejido que contuvieron al menos 60% de representación tumoral
4. Muestra tumoral con patrones acinares, con patrón de Gleason mayor de 3 y puntaje 3+3.

5. Procedimientos

5.1. Procedimientos para el primer objetivo específico, determinar los niveles de expresión génica y proteica de HPGD en tejido tumoral de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata localmente/regionalmente avanzado y correlacionarlos con la recurrencia bioquímica y los GGG 1-5.

5.1.1. Análisis de expresión génica de *HPGD* por qRT-PCR

5.1.1.1. Corte de láminas.

La extracción de RNA de las muestras se realizó a partir de tejido tumoral y no tumoral mediante microdissección realizada por patólogo experto siguiendo el protocolo descrito por Parra et al[123]. Para esto se tomaron 35 casos que contaban con el material suficiente para la extracción (14 que expresaban HPGD y 21 negativos por Inmunohistoquímica).

Los tejidos de FFPE de los casos seleccionados se llevaron a congelación con un tiempo mínimo de una hora. Posteriormente, se realizaron 3-5 cortes de 4 μm de espesor de los tejidos FFPE usando microtomo para histotecnología con cuchillas desechables de alto perfil PATHO CUTTER con recubrimiento PTFE. (REF.: 08-640-1marca ERMA BY KAI). Se dispuso de dos o tres cortes de tejido según el tamaño de este en láminas histológicas cargadas positivamente (láminas COLORFROST PLUS, marca THERMO FISHER SCIENTIFIC), estas fueron dejadas en secado en un tiempo mayor a 24 horas a temperatura ambiente.

5.1.1.2. Desparafinización y tinción con hematoxilina y eosina (H&E)

Posteriormente, las láminas fueron desparafinadas mediante gradientes descendentes de alcoholes, para la cual se sumergieron en xilol 100% durante 5 minutos dos veces; luego, fueron sumergidas en concentraciones descendientes de etanol 100%, 95% y 70% cada concentración durante 30 segundos y seguido de un enjuague en agua destilada durante 30 segundos. Las láminas fueron teñidas con hematoxilina/eosina y finalmente se conservaron sumergidas en agua destilada para hidratación durante algunos minutos previos a la microdissección.

5.1.1.3. Microdissección de regiones tisulares de las láminas de FFPE

Previo a la realización de la microdissección las láminas se sumergieron en glicerol al 3% para la correcta visualización a través de microscopía óptica por parte del patólogo para identificar las áreas tumorales y adyacentes al tumor; posteriormente, estas áreas fueron microdisseccionadas con el uso de cuchillas quirúrgicas estériles, las cuales fueron posteriormente recolectadas en tubos de Eppendorf de 1,5 mL.

5.1.1.4. Selección de tejido de control para análisis de expresión de HPGD

Como control de la expresión de HPGD se utilizó una muestra de tejido de vejiga urinaria de paciente masculino, muestra libre de compromiso tumoral preservada en formol obtenida del Departamento de Patología del INC. Dicho tipo tisular se seleccionó a partir de una búsqueda en la plataforma informática THE HUMAN PROTEIN ATLAS (THPA) (<https://www.proteinatlas.org>) en donde se evidenció que este tejido es de marcación alta para este gen.

Posteriormente, patólogo adscrito al INC recolectó urotelio de vejiga mediante cortes de aproximadamente 4 mm² en tubos de Eppendorf de 1,5 mL, se realizaron lavados múltiples para eliminación de formol, se sumergieron las muestras en agua desionizada durante 10 minutos, posteriormente en gradientes ascendentes de etanol 70%, 90%, 96% y 100% durante 30 segundos cada grado, en xilol 100% durante 10 minutos, luego en gradientes

descendientes de etanol 100%, 96%, 90% y 70% durante 30 segundos cada grado y finalmente agua desionizada durante 10 minutos. Se dejó almacenado en tubos de Eppendorf de 1,5 mL para posterior realización de extracción de RNA.

5.1.1.5. Protocolo de extracción de RNA

Inmediatamente después de la microdissección de los especímenes y la preparación del control se realizó la extracción de ácidos nucleicos, se utilizó el kit MagMAX™ FFPE DNA/RNA Ultra (Applied Biosystems.) siguiendo las recomendaciones del fabricante con modificaciones. Dado que durante el proceso de desparafinización se utilizó xilol y etanol se omitió este paso en el protocolo. Adicionalmente, se disminuyó de 20 minutos a 15 minutos el uso de DNAsa. Finalmente, el RNA fue recuperado en 30µl de buffer eluyente del kit. Estas modificaciones permitieron mejorar la calidad de extracción de RNA.

5.1.1.6. Determinación de la calidad y cantidad de RNA

Se determinó la cantidad y calidad de RNA y el grado de contaminación con alcoholes y proteína mediante las razones 260/280 y 260/230, que éste pudiese contener mediante espectrofotometría con el equipo Nanodrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Wilmington, USA), también se determinó la cantidad de RNA con el equipo Qubit mediante fluorometría ([Qubit™ Flex Fluorometer](#)).

5.1.1.7. Ensayos de PCR en tiempo real

La expresión del gen *HPGD* en los tejidos FFPE se determinó mediante la técnica de qRT-PCR, que consiste en un método de cuantificación en tiempo real de los productos de PCR. El DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir de RNA total con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription sin inhibidores de RNasa (Applied Biosystems) y utilizando primers aleatorios. A partir del template de cDNA sintetizado, se efectuó la qRT-PCR implementando el kit TaqMan™ Gene Expression Assay (FAM) (Applied Biosystems™) en conjunto con su respectiva TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems™) para cada uno de los genes amplificados (tabla 5-1); Estos procedimientos se efectuaron

acorde a las recomendaciones del fabricante. Las muestras se procesaron por duplicado y se utilizó agua como control negativo y urotelio de vejiga como control positivo.

Los resultados de se analizaron mediante cuantificación relativa usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ con GAPDH como control endógeno para estimar los cambios en los niveles de expresión entre casos con RB respecto a casos sin RB y entre los GGG. Pruebas de χ^2 o el test exacto de Fisher fueron aplicadas para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 5-1: Genes y sondas incluidos en los ensayos de qRT-PCR.

Nombre del gen	Gen	ID gen
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Control endógeno)	GAPDH	HS02758991_G1.
Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	<i>HPGD</i>	Hs00960590_m1

5.1.2 Análisis de expresión proteica de HPGD por Inmunohistoquímica

La expresión proteica de HPGD se determinó en muestras tisulares FFPE de los pacientes incluidos. Se tomaron láminas con cortes de 4 μ m de espesor del tejido de cada espécimen. Posteriormente, se realizó desparafinación de los tejidos en una serie de xilenos y luego fueron deshidratadas con etanol a diferentes concentraciones. La recuperación antigénica inducida por calor se realizó sumergiendo las láminas en una solución de tampón de ácido cítrico 10 mM (pH 6) a temperatura de ebullición durante 30 minutos con el uso de energía de microondas. Posteriormente, los bloques fueron inmersos en una dilución 1/10 de peróxido de hidrógeno (Hydrogen Peroxide Block UltraVision) por 10 min a temperatura ambiente, con el fin de eliminar la peroxidasa endógena. Después de un bloqueo de 60 minutos con suero de cabra normal al 10% en PBS (Dako), las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-humano 15-PGDH/HPGD (NBP2-00490, anticuerpo monoclonal de origen murino, Novus

Biologicals) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizaron dos lavados con TBS 1/10 (Dako, Tris-Buffered Saline, pH 7.6) con el fin de remover el exceso de anticuerpo. Enseguida se incubó con los anticuerpos secundarios biotinilados por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se incubaron con diaminobencidina para el desarrollo del color y se realizó contraste con hematoxilina. Para todos los ensayos de inmunohistoquímica se incluyeron controles positivos indicados en la página de THPA (amígdala para CD4, CD8, CD20 y Granzima B; urotelio de vejiga urinaria para HPGD y colon para ERG).

La lectura de resultados se realizó con el uso de microscopía óptica por parte de patólogos expertos. Se determinó la localización de la proteína (tumor/periferia) y el porcentaje de expresión indicado como el promedio de células marcadas como positivas relativo a otras poblaciones celulares (0 = ausencia de células positivas, 1 = <10% de células positivas, 2 = 10% a 50% de células positivas, 3 = 51% a 100% de células positivas). No se tuvieron en cuenta las células tumorales necróticas o queratinizadas. Los datos se registraron en una hoja de Excel. Las variables cualitativas se analizaron calculando frecuencias absolutas y relativas.

5.2. Procedimientos para el segundo objetivo específico, determinar la densidad y el fenotipo de los linfocitos T, infiltrativos y periféricos del tumor, en tejido prostático de pacientes con cáncer de próstata localmente/regionalmente avanzado y su correlación con la recurrencia bioquímica y los GGG 1-5.

La evaluación de la población de TIL se realizó por inmunohistoquímica como se describió para dicha técnica previamente para el primer objetivo específico. Se utilizaron anticuerpos primarios contra ERG, CD4+, CD8+, granzima B, FOXP3 y CD20 humanos. Para el caso

de los antígenos CD4 y CD8 se utilizó tinción dual CD4 y CD8. Para esta técnica, cada sección de tejido de 2-4 μm montado en láminas fue secado durante toda la noche a 37°C antes del procesamiento. El procedimiento se realizó en el equipo Ventana Benchmark XT automated slide preparation system (Roche Diagnostics, Meylan, France) con el uso de 2 kits diferentes de revelado para obtener cada proteína teñida con un color diferente, magenta para CD4 y café para CD8.

El número de LT para cada marcador se contó por el método de conteo clásico con el microscopio óptico usando una rejilla ocular con un aumento de 40x. Las células marcadas se contaron en toda la sección de tejido y se expresaron en términos de relación CD4/CD8 o viceversa, tanto para la región tumoral como para el estroma adyacente y periférico, indicando el promedio de células marcadas como positivo relativo a otras poblaciones celulares, también se evaluó el nivel de infiltración linfocitaria como alta, media y baja en cada una de las zonas tisulares. Posteriormente, se agruparon estos porcentajes como una variable dicotómica, baja y alta expresión. El conteo se realizó dos veces para cada lámina.

5.3. Procedimientos para el tercer objetivo específico, correlación de los niveles de expresión de HPGD de acuerdo con la densidad y el fenotipo de LT en los desenlaces de RB

La correlación entre la densidad de LT, según el fenotipo, con el nivel de expresión de *HPGD* (determinado mediante niveles) se realizó mediante tablas de contingencia y pruebas de χ^2 o test exacto de Fisher.

Se realizaron tablas y figuras que muestran la relación entre las variables y su significancia. Finalmente, se realizaron análisis univariados para determinar la significancia estadística entre la expresión de *HPGD*, el fenotipo de LT prevalente en la muestra y el riesgo de RB

según GGG. No se realizaron análisis multivariados debido a la reducción del n en los grupos de estudio. Para todos los análisis estadísticos descritos en este trabajo se utilizó *Rstudio* y GraphPad Prism 9; y la significancia estadística fue determinada con un valor de $p < 0.05$.

5.4. Análisis In silico de expresión de RNA

5.4.1. Recolección de datos

La información fue obtenida a partir de The Cancer Genome Atlas (TCGA) y fue procesada por recount2 [124] para el análisis de los datos. Se descargaron recuentos genéticos para todos los casos de CaP, esta base de datos está constituida por 520 muestras, 409 pertenecientes de zonas tumorales, la base de datos contiene la información clínico-patológica bajo las mismas condiciones de los criterios de inclusión aplicados a la base de datos del INC, lo cual permitió hacer la comparación entre los desenlaces de RB, GGG y DEG (por sus siglas en inglés Differential Expression Genes) según región tisular.

5.4.2. Preprocesamiento de datos

Los datos en recount2 se procesaron con Rail-RNA [124]. Se realizó un control de calidad con gráficos de densidad y gráficos de caja para identificar que las muestras seleccionadas tuvieran una distribución similar antes y después de la normalización. Además, se realizó una gráfica multidimensional para identificar muestras atípicas.

5.4.3. Análisis de poblaciones leucocitarias en pacientes con CaP

Se hizo un análisis de deconvolución para determinar la proporción de diferentes tipos celulares en el tejido tumoral, se utilizó la herramienta Xcell (<https://xcell.ucsf.edu/>)

5.4.4. Identificación de genes expresados diferencialmente

El conteo de genes de mRNA se analizó en Galaxy [125]. Los datos se normalizaron de acuerdo al tamaño de la biblioteca utilizando el método de media recortada de valores M (TMM). Los genes con menos de 1 conteo por millón de lecturas mapeadas (CPM) en al menos el 50% de las muestras se consideraron no expresados y se eliminaron. Se utilizó el método limma-voom para identificar los DEG.

6. Resultados

6.1. Características clínico-patológicas

En este estudio se incluyó un total de 669 pacientes diagnosticados con CaP en el INC entre los años 2007 a 2013, de los cuales sólo 98 cumplieron con los criterios de inclusión para el análisis estadístico. Como se observa en la tabla 6-1 la mediana de edad fue de 64 años (mínima de 47 y máxima de 75 años). Un total de 59 pacientes (60,2 %) no presentaron compromiso de borde, 92 pacientes (93,9%) no presentaron compromiso ganglionar, 33 pacientes (33,7%) presentaron bajo riesgo según la escala de Gleason <7 o $<3+4$. La mediana de niveles de PSA inicial fue de 9.00 ng/ml. Ninguno de los pacientes recibió tratamiento previo diferente a la PR ni previo al desarrollo de RB, tampoco presentaron diagnóstico previo ni concurrente de otro tipo de cáncer.

Cuando se analizaron las características clínicas entre los grupos de RB y no RB se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos en el compromiso de borde, la escala de Gleason, el riesgo y el estadio clínico según el estatus de RB. No se evidencio diferencias significativas en la edad de presentación de cáncer, el compromiso ganglionar, ni en los niveles de PSA prequirúrgico según el estatus de RB (tabla 6-2).

Tabla 6-1: Características clínicas en pacientes con diagnóstico de CaP (N = 98).

Característica		Total (N = 98)
Edad (años)	Mediana [RIC*]	64.0 [9.75*]
Compromiso de bordes, n (%)	Sí	39 (39.8)
	No	59 (60.2)
Compromiso ganglionar, n (%)	Sí	6 (6.10)
	No	92 (93.9)
GLEASON prostatectomía, n (%)	3+3	33 (33.7)
	3+4	36 (36.7)
	3+5	1 (1.03)
	4+3	26 (26.5)
	4+4	1 (1.03)
	4+5	1 (1.03)
Riesgo, n (%)	Bajo	33 (33.7)
	Intermedio	41 (41.8)
	Alto	24 (24.5)
Estadio, n (%)	1	2 (2.04)
	2a	26 (26.5)
	2b	21 (21.4)
	2c	10 (10.2)
	3b	38 (38.8)
	3c	1 (1.03)
Niveles de PSA	Mediana [RIC*]	9.00 [7.92]
Recurrencia bioquímica, n (%)	Sí	43 (43.9)
	No	55 (56.1)

*: Rango intercuartílico (RIC)

Tabla 6-2: Características clínicas en pacientes con diagnóstico de CaP, teniendo en consideración la RB (N = 98).

Característica		Recurrencia bioquímica (RB)		p-valor
		Sí (n = 43)	No (n = 55)	
Edad† (años)	Mediana [RIC*]	65.0 [7.50]	64.0 [10.0]	0.389
Compromiso de bordes§, n (%)	Sí	25 (64.1)	14 (35.9)	0.001
	No	18 (30.5)	41 (69.5)	
Compromiso ganglionar‡, n (%)	Sí	5 (83.3)	1 (16.7)	0.083
	No	38 (41.3)	54 (58.7)	
GLEASON prostatectomía¶, n (%)	3+3	8 (2.42)	25 (75.8)	0.002
	3+4	15 (41.7)	21 (58.3)	
	3+5	1 (100)	0 (0.00)	
	4+3	18 (69.2)	8 (30.8)	
	4+4	0 (0.00)	1 (100)	
	4+5	1 (100)	0 (0.00)	
Riesgo§, n (%)	Bajo	8 (24.2)	25 (75.8)	0.002
	Intermedio	18 (43.9)	23 (56.1)	
	Alto	17 (70.8)	7 (29.2)	
Estadio¶, n (%)	1	0 (0.00)	1 (100)	0.040
	2a	7 (26.9)	19 (73.1)	
	2b	7 (33.3)	14 (66.7)	
	2c	6 (60.0)	4 (40.0)	
	3b	22 (57.9)	16 (42.1)	
	3c	1 (100)	0 (0.00)	
Niveles de PSA†	Mediana [RIC*]	10.6 [9.10]	7.80 [6.85]	0.071

*: Rango intercuartílico (RIC)

†: Test de Mann–Whitney–Wilcoxon

‡: Test exacto de Fisher

¶: Test de Fisher-Freeman-Halton

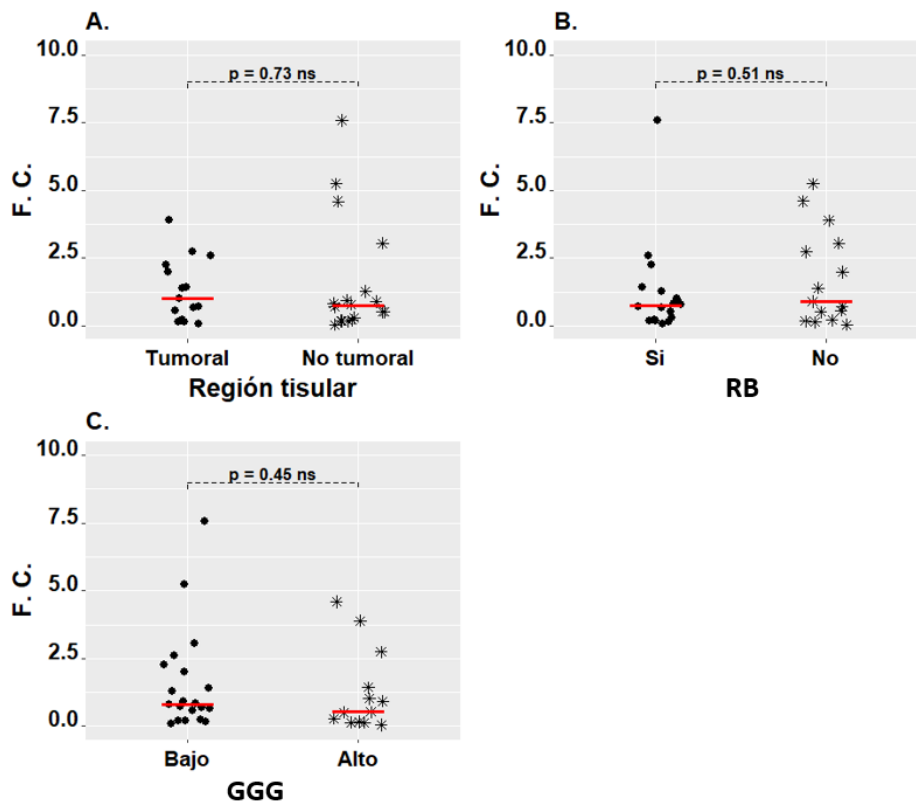
§: Test χ^2 Pearson's

6.2. Análisis de la expresión génica y proteica de HPGD según RB y GGG.

6.2.1 Análisis de expresión de HPGD por PCR en tiempo real según recurrencia bioquímica y GGG.

De las 35 muestras utilizadas, en 13 muestras no se logró obtener la cantidad suficiente de RNA para la realización de la RT-PCR y tres muestras no amplificaron durante la q-PCR. En total se obtuvieron diez muestras que expresaban HPGD y nueve muestras negativas con un adecuado nivel y calidad de RNA para la realización de la qRT-PCR, 11 muestras pertenecen a pacientes que desarrollaron RB, 11 estaban relacionadas con grupos grados Gleason de bajo riesgo y 10 expresaron positividad para HPGD por inmunohistoquímica. Se realizaron análisis estadísticos comparando el desenlace de RB y los grupos grado Gleason, adicional, también se tomó en cuenta las regiones tisulares sin obtener diferencias significativas entre los parámetros de análisis como se observa en la figura (Figura 6-1)).

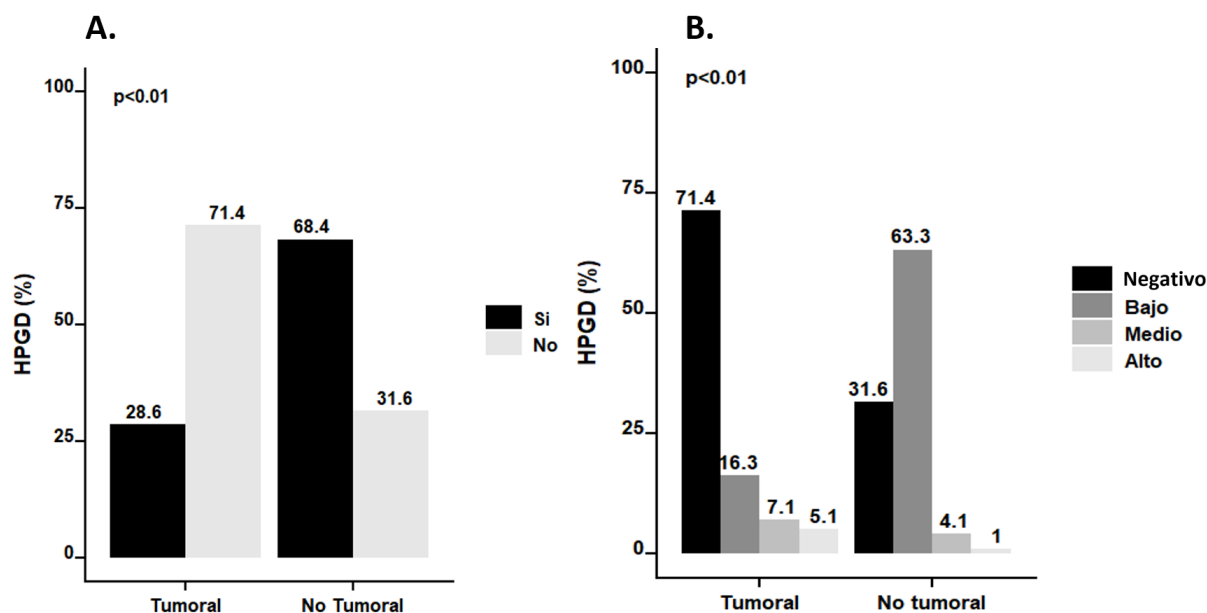
Figura 6-1: Expresión de *HPGD* según región tisular (A) recurrencia bioquímica (B) y Grupo Grado Gleason (C). (F.C. Fold Change)



6.2.2 Análisis de expresión proteica de HPGD por inmunohistoquímica según RB, región tisular y GGG

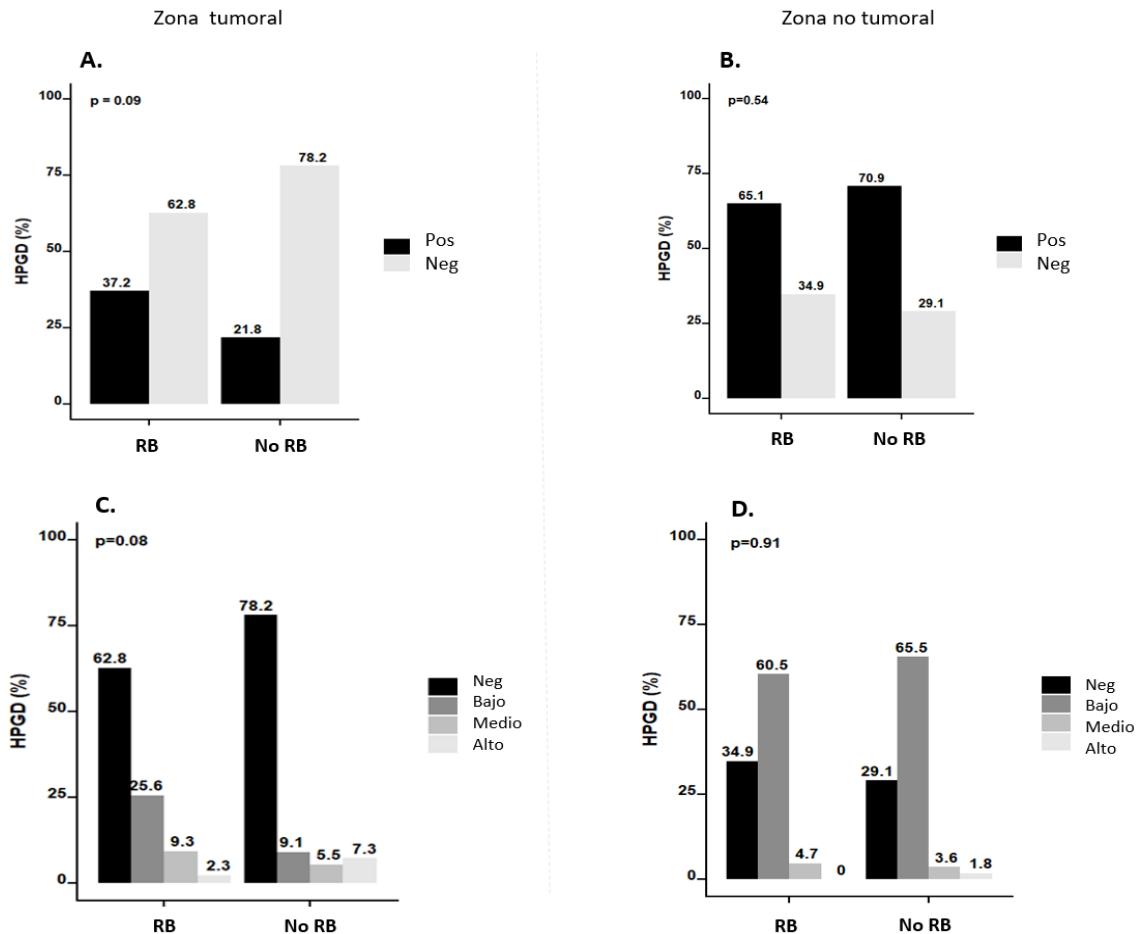
De las 98 muestras analizadas 76 (77.5%) presentaron expresión de la proteína HPGD, una mayor frecuencia de expresión de HPGD fue observado (53,9%) en los pacientes sin RB con respecto a los que presentaron RB (46,1%), sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los grupos ($p=0.420$). Con el fin de establecer si había diferencias según el tipo tisular se analizó la expresión de HPGD en región tumoral y no tumoral. En la región no tumoral se observó una mayor frecuencia (68,4%) de expresión de HPGD comparado con la región tumoral (28,6%) ($p<0,01$), siendo esta región no tumoral caracterizada por ser de un bajo nivel de expresión de HPGD (63,3%) (Figura 6-2A y Figura 6-2B).

Figura 6-2: Expresión de proteína HPGD como positivo o negativo según región tisular (A) y nivel de expresión en alto, medio, bajo o negativo según región tisular (B). Se hallan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$ prueba χ^2 de Pearson) para la expresión de la proteína HPGD entre las regiones tumoral y no tumoral. También se evidencian diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$ test exacto de Fisher) en el nivel de expresión de la proteína HPGD entre las regiones tumoral y no tumoral.



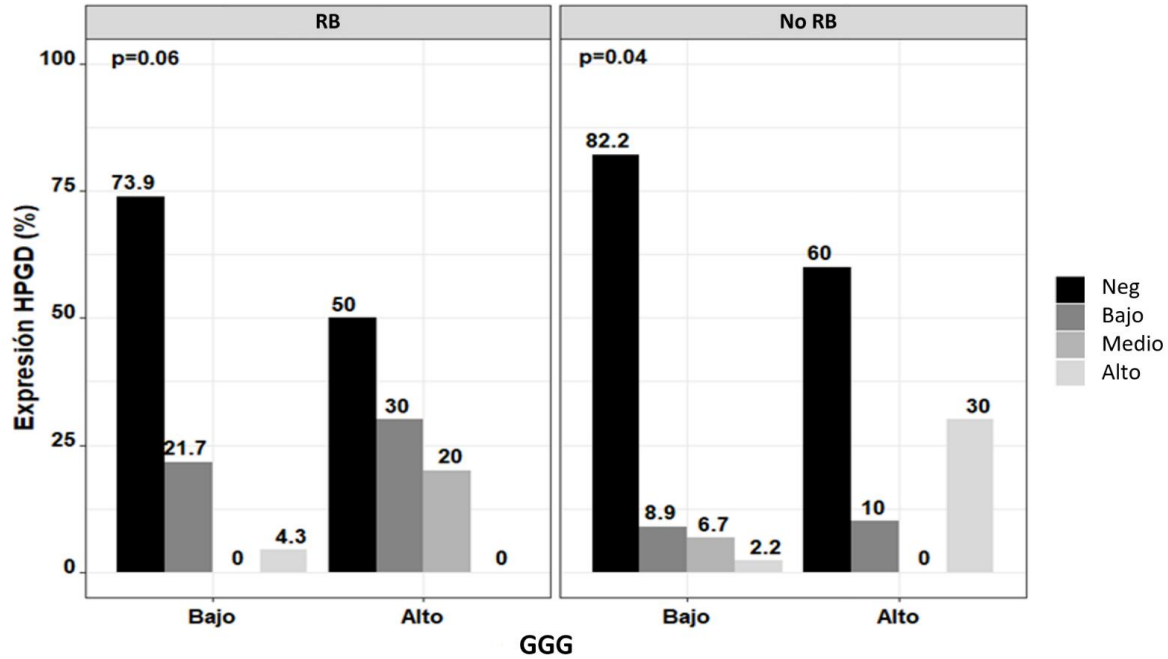
Se evaluó la expresión de HPGD en estas regiones según el desenlace de RB. Como se observa en la figura 6-3 A, en la región tumoral hubo una mayor frecuencia positiva de HPGD en los pacientes que presentaron RB (37.2%) comparado con los que no presentaron RB (21.8%), sin embargo, esta no fue significativa ($p = 0,09$). En la zona no tumoral se observaron porcentajes similares de expresión de HPGD entre RB y No RB (66.1% Vs 70.9%, respectivamente) (Figura 6-3 B). Posteriormente, se analizaron los niveles de expresión de HPGD en estas dos regiones dependiendo el desenlace de RB. Como se observa en la figura 6-3 C, una mayor frecuencia de expresión baja fue observada en los pacientes que presentaron RB (25,6%) vs. no RB (9,1%) en tejido tumoral, aunque en las muestras sin RB se observó un mayor nivel de expresión de HPGD, pero sin una diferencia significativa ($p = 0,08$). En región no tumoral, los niveles de expresión de HPGD tampoco presentaron diferencias significativas según RB ($p = 0,91$) (Figura 6-3 D).

Figura 6-3: Expresión de proteína HPGD según región tisular y según desenlace de RB (A y B) y nivel de expresión según tisular y desenlace de RB (C y D). No se hallan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$ prueba χ^2 de Pearson) para la expresión de la proteína HPGD entre los desenlaces de RB tanto para la región tumoral como no tumoral. Tampoco se evidencian diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$ test exacto de Fisher) en el nivel de expresión de la proteína HPGD entre paciente con RB y sin RB.



Con el fin de determinar si existe diferencias en la expresión de HPGD según el grado de Gleason, los pacientes fueron dicotomizados en bajo y alto riesgo según los GGG (Gleason igual o menor a 3+4 es riesgo bajo y Gleason 4+3 o mayor es riesgo alto). Como se observa en la figura 6-4, una mayor frecuencia de expresión baja (30%) y media (20%) de HPGD fue hallada en pacientes con Gleason alto vs Gleason bajo que tuvieron RB ($p = 0.06$). Por el contrario, en el grupo de pacientes sin RB se observó una mayor frecuencia de expresión alta de HPGD en los pacientes con Gleason alto (30%) vs Gleason bajo (2,2%), presentando una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.04$)

Figura 6-4: Niveles de expresión de proteína HPGD según desenlace de RB y riesgo definido por GGG. No se hallan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$, test exacto de Fisher) en el nivel de expresión de la proteína HPGD entre el riesgo bajo y alto según los GGG en los pacientes que desarrollaron RB. Se hallan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test exacto de Fisher) en el nivel de expresión de la proteína HPGD entre el riesgo bajo y alto según los GGG en los pacientes que no desarrollaron RB.

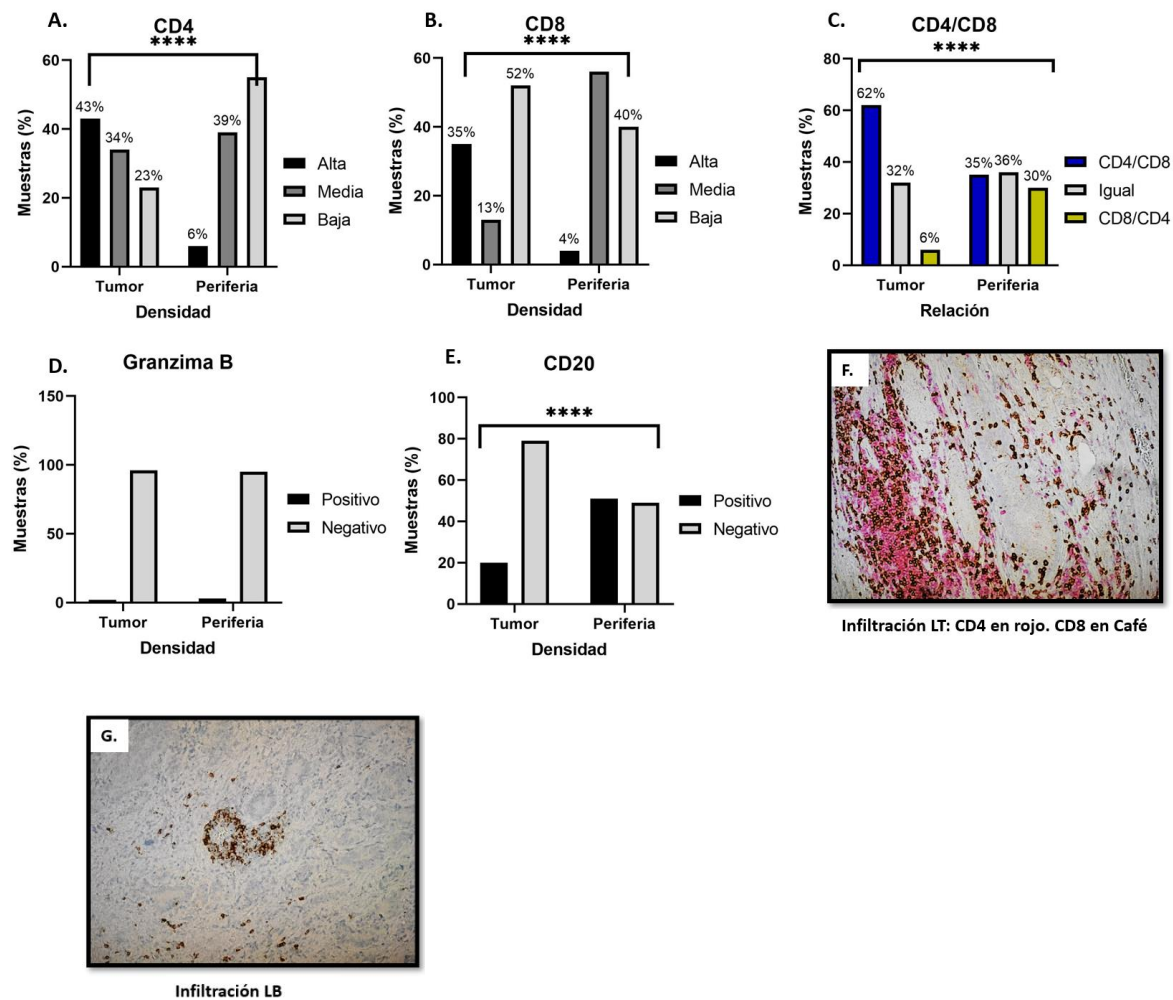


6.3. Análisis del inmunofenotipo y la densidad linfocitaria según región tisular, RB y GGG.

En el análisis de infiltrado linfocitario se observa que las poblaciones LT se expresan en el 100% de los casos tanto en región tumoral como no tumoral. Para los grados de infiltración linfocitaria, como se observa en la gráfica Figura 6-5 A, se halló una mayor frecuencia de alta infiltración (42%) intratumoral comparado con una baja frecuencia de alta infiltración periférica (6%) de LT CD4. Con relación a la densidad de LT CD8, se halló una mayor de infiltración alta (35%) tumoral comparado con una baja infiltración periférica (4%) (figura 6-5 B); y al evaluar la razón CD4/CD8 se halló un aumento en la región tumoral (62%) vs periferia (35%) con una diferencia significativa ($p < 0.01$); y aunque la razón CD8/CD4 también presentó una diferencia significativa entre las dos regiones, mantuvo niveles similares con la razón CD4/CD8 en la región periférica. (Figura 6-5 C).

Sin embargo, al evaluar la expresión de Granzima B, cerca del 97% de los casos fueron negativos en las dos regiones tisulares para este marcador (figura 6-5 D). En cuanto a la presencia de linfocitos CD20, se halló una mayor frecuencia positiva en la región no tumoral (51%) con respecto a la región tumoral (20,4%) ($p < 0.01$) (Figura 6-5 E y G).

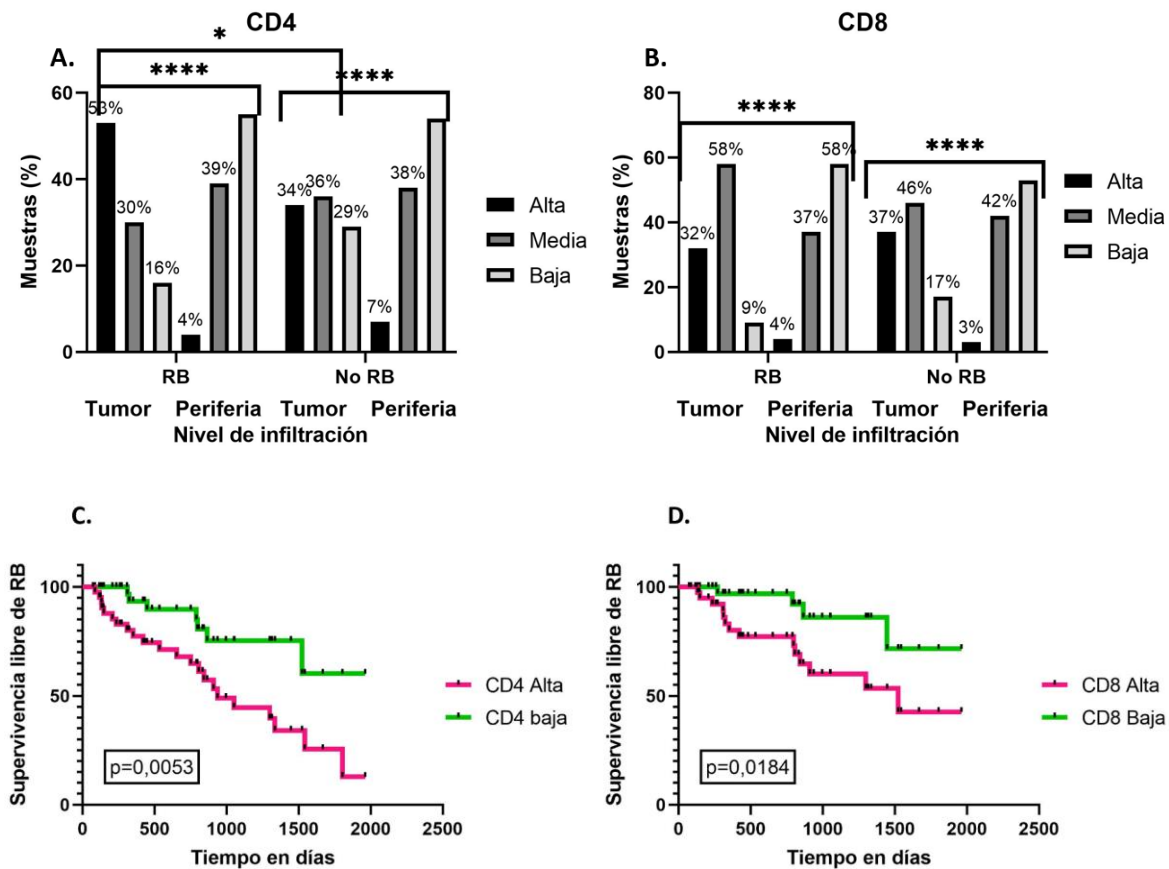
Figura 6-5: Nivel de expresión de CD4 según región tisular (A). Nivel de expresión de CD8 según región tisular (B). Relación de CD4/CD8 según región tisular (C). Expresión de Granzima B según región tisular (D). Expresión de CD20 según región tisular (E). Infiltración linfocitaria CD4 en rojo y CD8 en café (F). Infiltración de LB (G). (*niveles de significancia $p < 0.05$). Se hallan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$ prueba χ^2 de Pearson) en el nivel de expresión de las proteínas CD4 y CD8 entre la región tumoral y periférica como también la relación CD4/CD8 entre estas dos regiones. También se hallan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$, test exacto de Fisher) en el nivel de expresión de la proteína CD20 entre las dos regiones tisulares.



Al evaluar, el nivel de infiltración de LT según los desenlaces de RB y la región tisular, se continuó hallando una alta densidad tanto de CD4 como CD8 en la región tumoral vs periférica independiente de los desenlaces de RB (figuras 6-6 A y B). Se presenta una mayor frecuencia de alta densidad de TIL CD4 en los pacientes con RB (53%) vs los

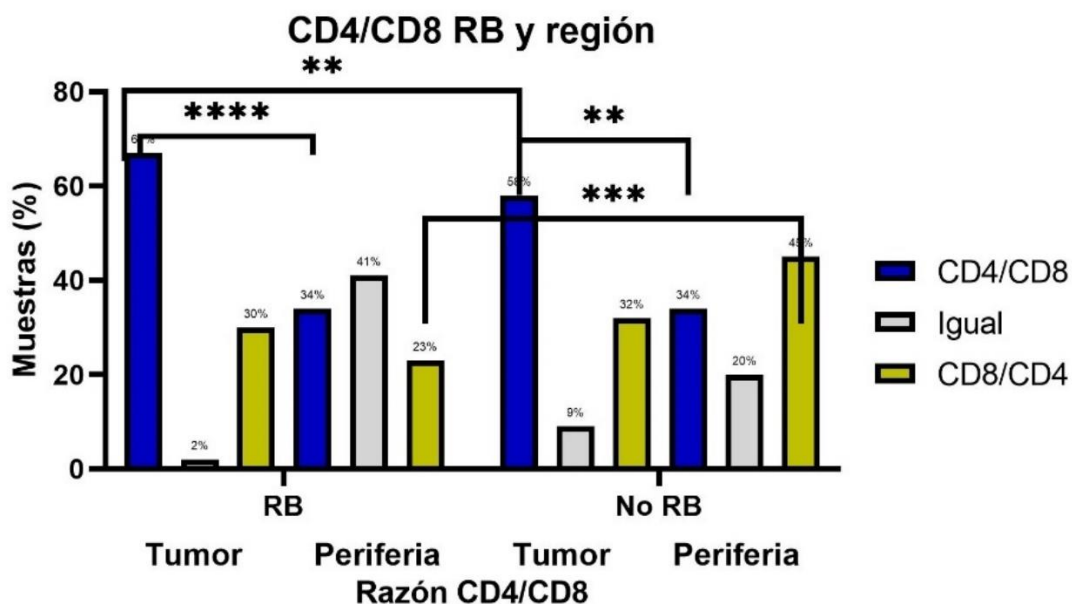
pacientes sin RB (35%) ($p = 0,0146$). Adicional, se observa una inversión total de los niveles infiltrativos de CD4 entre sus regiones en las muestras con RB, alta infiltración tumoral (53%) vs periférica (5%) ($p < 0,0001$); y también una diferencia significativa entre las regiones de las muestras sin RB, tumoral (35%) vs periférica (7%) ($p < 0,0001$) (figura 6-6 A). En cuanto los niveles de densidad de CD8 no se observaron diferencias entre los desenlaces de RB ($p > 0,05$); y a diferencia de los TIL CD4, los TIL CD8 presentaron una menor frecuencia de alta densidad, aunque fue también significativamente diferente a la región periférica tanto para RB y no RB ($p < 0,0001$ en ambos casos) (Figura 6-6 B). Igualmente, al analizar la densidad de TIL tanto CD4 como CD8 con el desenlace de supervivencia libre de RB, como se observa en las figuras 6-6 C y D los pacientes que presentaron una alta densidad de TIL tanto CD4 como CD8 presentaron una menor supervivencia libre de RB, la cual fue significativa en ambos casos.

Figura 6-6: Niveles de expresión de CD4 y CD8 (LT) según el desenlace de RB y región tisular (A y B). Kaplan Meier de supervivencia libre de RB según la densidad de TIL CD4 (C) y TIL CD8 (D). (*niveles de significancia $p < 0,05$, prueba χ^2 de Pearson)



Teniendo en cuenta que los niveles altos de infiltración linfocitaria se hallan en mayor frecuencia en las regiones tumorales con predominio CD4 (figuras 6-5 A,B y C), y que al evaluar entre RB y no RB sólo CD4 presentó diferencias significativas (figura 6-6 A), se evaluó si la razón CD4/CD8 en las distintas zonas tisulares según los desenlaces de RB podía continuar presentando diferencias. Los análisis de la razón CD4/CD8 presentaron también diferencias entre los desenlaces (RB y No RB) ($p < 0,0015$), y continuó siendo mayor en la zona tumoral con respecto a la periférica tanto para RB como no RB, presentándose diferencias significativas, en los pacientes con RB ($p < 0,0001$) y en los pacientes sin RB ($p = 0,0018$). En cuanto la relación CD8/CD4 esta se presentó en mayor frecuencia en la periferia de las muestras sin RB, y al comparar con la periferia de las muestras con RB se halló una significancia ($P = 0,0002$). Estos resultados sugieren la importancia de la relación CD8/CD4 en la región no tumoral de los pacientes sin RB.

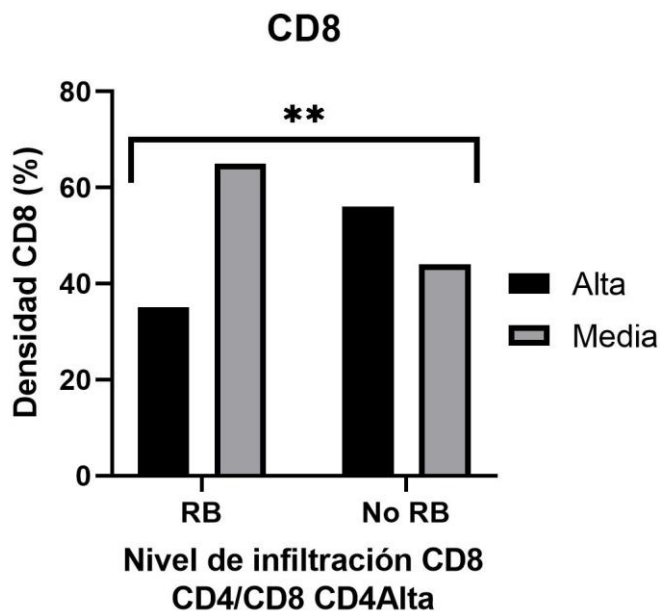
Figura 6-7: Relación de CD4/CD8 según el desenlace de RB y región tisular (*niveles de significancia $p < 0.05$, prueba χ^2 de Pearson)



Dado que la región tumoral presentó mayor frecuencia de infiltración de LT, con mayor densidad de TIL CD4 que TIL CD8 y una mayor razón CD4/CD8 con respecto a la periferia tanto en RB como no RB, se quiso analizar si había diferencias en las densidades de TIL CD8 en este contexto predominante (CD4/CD8 mayor, alta infiltración de CD4) según los

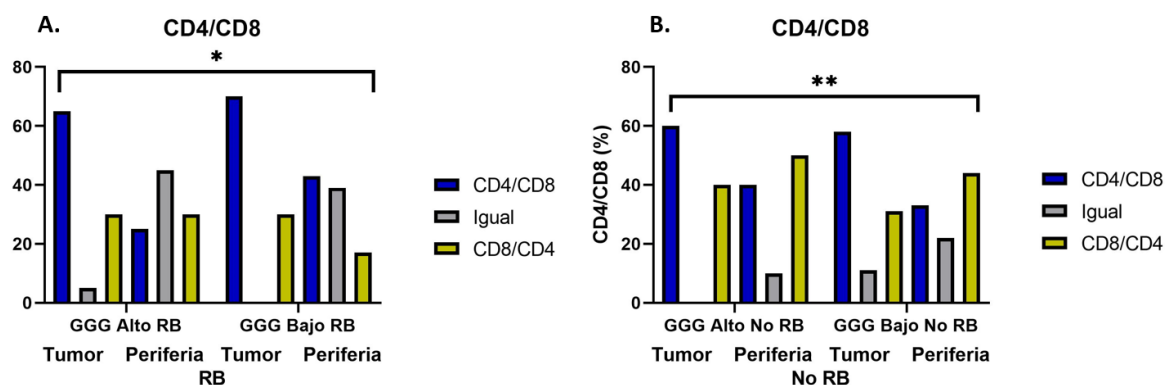
desenlaces de RB. Como se observa en la gráfica (Figura 6-8) los pacientes con RB presentaron una predominancia de densidad intermedia de TIL CD8, mientras que los pacientes sin RB presentaron una predominancia de densidad alta de TIL CD8 ($p=0,0044$). Estos resultados sugieren que los pacientes sin RB tienden a tener una mayor densidad de TIL CD8 comparado con los pacientes con RB en ese contexto específico.

Figura 6-8: Nivel de expresión de CD8 en el contexto de CD4/CD8 y alta expresión de CD4 intratumoral en paciente con RB y sin RB (*niveles de significancia $p<0.05$, test exacto de Fisher)



Teniendo en cuenta el riesgo determinado por los GGG, se quiso analizar si había diferencias en cuanto a la infiltración y la razón CD4/CD8 en estos pacientes. No se encontraron diferencias significativas entre riesgo alto y bajo para la infiltración y la relación CD4/CD8 (Anexo A). Sin embargo, cuando se dicotomizó cada desenlace de RB en los riesgos por GGG se halló diferencias tanto en RB como en no RB, siendo más marcada en los pacientes sin RB ($p= 0,0033$) (figura 6-9 B) que en los pacientes con RB ($p= 0,0158$). Adicional, para los pacientes sin RB se observó una notoria elevación de la razón CD8/CD4 en el subgrupo de riesgo alto GGG (figura 6-9 B).

Figura 6-9: Relación de CD4/CD8 en todas las regiones tisulares según desenlace de RB y riesgo determinado por GGG. Pacientes con RB (A) y pacientes sin RB (B). (*niveles de significancia $p < 0.05$, prueba χ^2 de Pearson)



6.4. Correlación de los niveles de expresión de HPGD de acuerdo con el fenotipo y densidad de LT en casos RB y GGG.

Con el fin de determinar si los niveles de expresión de HPGD tienen alguna asociación con la infiltración y el fenotipo de LT en los casos con RB y GGG, se tomaron sólo los casos que tuvieron una alta expresión de HPGD dado que presentaron un nivel de significancia según RB y GGG (figura 6-4). El análisis descriptivo muestra que la mayoría de estos casos se asocia a No RB, con un riesgo alto según GGG y una tendencia baja densidad de TIL ($p < 0,05$). (tabla 6-3)

Tabla 6-3: Correlación de los niveles de expresión de HPGD de acuerdo con el fenotipo y densidad de LT en casos RB y Gleason. Análisis descriptivo de 5 casos

Región Tisular	Desenlace	ERG	HPGD	GGG	CD4/CD8	CD4	CD8
Tumor	No RB	Negativo	Alto	Alto	CD4 MAYOR	Alta	Alta
		Negativo	Alto	Alto	CD4 MAYOR	Media	Baja
		Negativo	Alto	Bajo	IGUAL	Media	Media
		Alto	Alto	Alto	CD8 MAYOR	Baja	Baja
Tumor	RB	Negativo	Alto	Bajo	CD4 MAYOR	Alta	Media

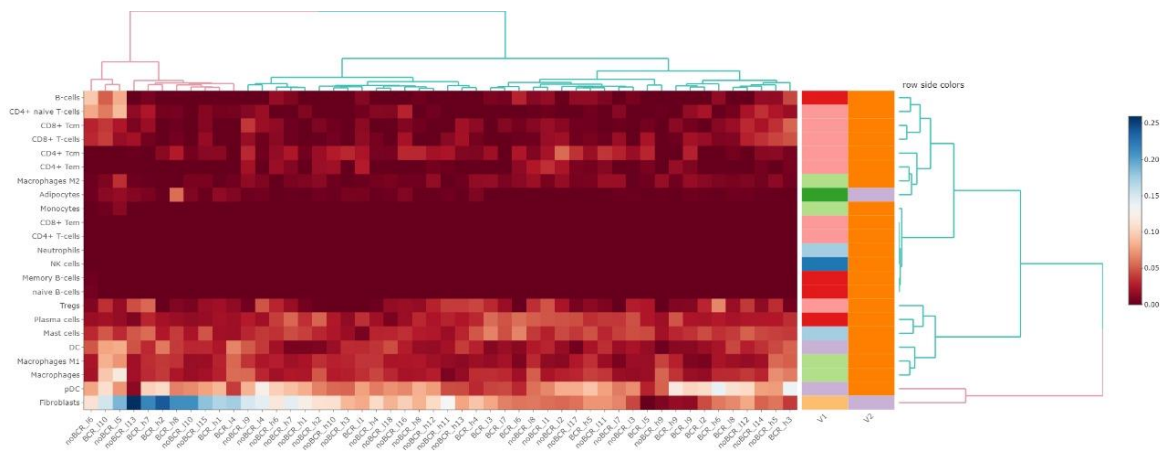
6.5. Análisis in Silico

Con el fin de determinar si las poblaciones leucocitarias y la expresión de HPGD en pacientes con CaP se correlacionan entre ellos, se utilizaron los datos de transcriptómica de TCGA.

6.5.1. Análisis de poblaciones leucocitarias en pacientes con CaP

El análisis realizado en XCell de genes relacionados con poblaciones leucocitarias mostró una baja expresión en general. Para las poblaciones de: Monocitos, CD8+Tem, CD4+, Neutrófilos, NK, LB de memoria y LB vírgenes no se observó expresión intratumoral en todos los pacientes tanto con RB como sin RB, lo que se podría sugerir que el CaP es en general frío inmunológicamente. (Figura 6-10)

Figura 6-10: Mapa de calor no supervisado de DEG en muestras tumorales de la base datos de TCGA. (Imagen desarrollada con XCell)



6.5.2 Análisis transcriptómico en CaP

Con los datos de transcriptómica de TCGA, se realizó un análisis de la expresión génica de HPGD entre los pacientes con RB y sin RB, sin observarse diferencias significativas entre los dos grupos. Dado lo anterior se decidió analizar teniendo en cuenta su nivel de expresión, el estatus de RB y la región tisular para identificar la relevancia de la expresión de *HPGD* en la biología molecular del CaP. Se definió que el gen se expresa diferencialmente si el cambio de expresión lineal es superior a 1,5 ($0,584 \log_2$) o inferior a -1,5 ($-0,584 \log_2$) y la tasa de falso descubrimiento (FDR) es inferior a 0,05.

Al realizar un análisis no supervisado de la expresión génica en las muestras de acuerdo con el nivel de expresión de HPGD, la región tisular y el desenlace de RB, se halló la presencia de tres posibles perfiles de DEG. Se evidenció la generación de dos grupos de acuerdo con la baja y alta expresión de IL-2. El grupo de baja expresión se relaciona en su mayoría con las muestras que presentaron RB tanto en alto como en bajo grado de expresión de HPGD y en este grupo tiende a observarse una DEG de TFG- β y FOXP3 (sobreexpresada); y de CD8A, CD3 y perforinas (expresión a la baja). El grupo de alta expresión de IL-2 se organizó en dos subgrupos, el primero con una DEG a la baja de HPGD y CD68; y una DEG al alta de CTLA-4 y ERG, relacionado en su mayoría a muestras sin RB; y en el segundo subgrupo se organizaron la mayoría de las muestras de tejido no tumoral casi en su totalidad asociadas a una DEG a la baja de FOXP3 y ERG (Figura 6-11).

Dado lo anterior, se quiso comparar el transcriptoma de un grupo amplio de genes relacionados con la respuesta inmunológica de la región tumoral con RB y sin RB vs el de la región no tumoral para identificar posibles DEG. En primer lugar, se comparó el transcriptoma del tejido tumoral con alta y baja expresión de HPGD en pacientes con RB (denominados BCR_h y BCR_l; 11 y 13 muestras respectivamente) con el transcriptoma de tejido normal (denominados Ctr, 35 muestras). En segundo lugar, se comparó tejido tumoral con alta y baja expresión de HPGD en pacientes sin RB (denominados noBCR_h y noBCR_l; 17 y 19 muestras respectivamente) con el transcriptoma de tejido normal (Ctr,

35 muestras). Se observó un repertorio de DEG en todos los grupos comparativos, se encontró una mayor expresión de un gen relacionado con inmunomodulación en los cuatro grupos, siendo congruente en todos los grupos la alta expresión de FOXP3. En las muestras de pacientes con baja expresión de HPGD se encontró adicional la sobreexpresión de TGF- β , CTLA-4 y ERG; mientras que en los subgrupos de RB se halló en concordancia la alta expresión de CD163. Sólo en el subgrupo de RB con alta expresión de HPGD no se encontró DEG relacionada con infiltración linfocitaria a la baja. (Tabla 6-4).

Figura 6-11: Mapa de calor no supervisado de DEG en muestras tumorales y no tumorales de la base datos de TCGA.

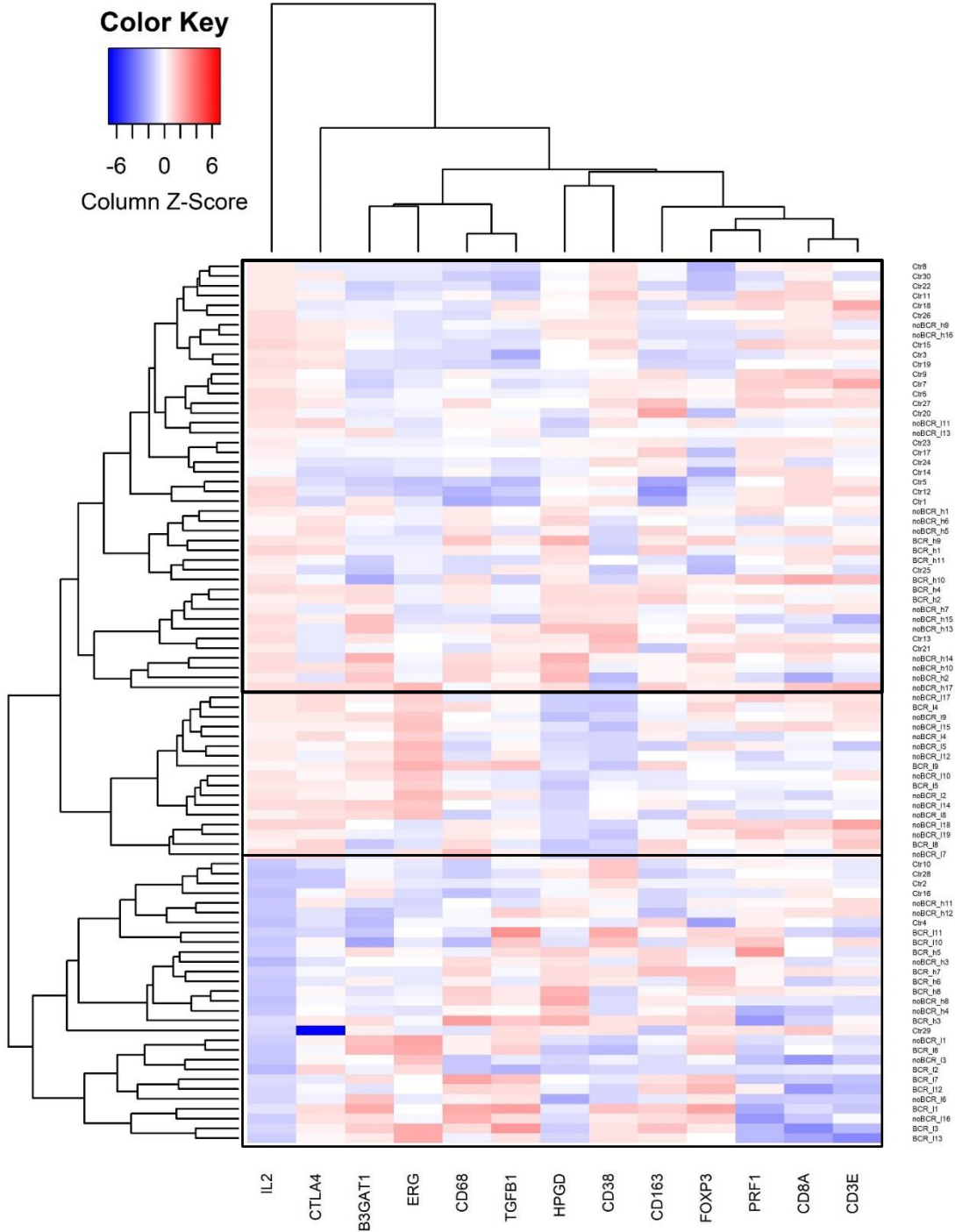


Tabla 6-4: DEG de muestras tumorales vs no tumorales según desenlace de RB y niveles de expresión de *HPGD* de pacientes de la base de datos de TCGA.

RB			No RB		
Tumor_HPGD_Alto vs Normal			Tumor_HPGD_Alto vs Normal		
	FC	pvalue		FC	pvalue
Foxp3	1,1327	0,00015	FOXP3	0,8607	0,00142
CD68	1,0551	0,00033	CD68	0,7704	0,00943
CD163	1,3018	0,02499	CD57	1,5046	0,03686
			CD38	-2,1847	0,02509
			CD8A	-0,6195	0,02509
			CD20	-1,8313	0,03686
Tumor_HPGD_Bajo vs Normal			Tumor_HPGD_Bajo vs Normal		
FoxP3	1,2681	0,00003	FOXP3	0,9156	0,00009
CD68	0,7298	0,01483	CD68	0,6008	0,01487
TGFB1	0,9342	0,00005	TGFB1	0,6029	0,00153
CTLA4	1,3626	0,00365	CTLA 4	1,4638	0,00007
ERG	3,6790	0,00003	ERG	3,8129	0,00000
CD163	1,0310	0,02727	CXCL9	1,7574	0,00009
PRF	-0,5532	0,02108	CXCL10	2,0023	0,00000
IL2	-3,8614	0,01115	CD57	1,8744	0,00153
CD8A	-1,0932	0,00023	CD8A	-0,7587	0,00153
CD38	-2,3319	0,01309	CD38	-3,3502	0,00007
CD3E	-0,6652	0,01428	IL1-A	-2,7740	0,01689
			CD20	-1,0245	0,18220

7. Discusión

A pesar de que los parámetros clínicos e histológicos están bien establecidos en la estimación del pronóstico en el CaP temprano, la identificación de biomarcadores adicionales para predecir con mayor precisión el curso de la enfermedad y comprender mejor la biología heterogénea del CaP son aún necesarios. En el estudio preliminar del grupo de investigación, se observó que la sobreexpresión génica de HPGD se asoció a un mayor riesgo de RB dentro de los 5 años posteriores a la PR. Otros estudios han relacionado que una desregulación de la expresión de *HPGD* puede estar asociada a los procesos tumorigénicos en diferentes tipos de cáncer, indicando una función de gen supresor de tumores [37]. En este estudio se analizó tanto la expresión génica como proteica de HPGD con el fin de esclarecer si había una relación en contra o favor de la RB en el CaP.

Nuestros resultados de expresión génica mostraron una baja expresión de HPGD tanto en tejido tumoral como no tumoral. Estos resultados pueden ser explicados en parte por una expresión génica baja de HPGD en tejido prostático normal, según la información que se encuentra en las bases de datos de TCGA reportadas en THPA [126]; incluso, en muestras de CaP esta expresión puede encontrarse en niveles aún más bajos o negativos. Esta disminución de la expresión génica de *HPGD* en el CaP puede ser explicada en parte por la presencia del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* (fusión génica que ocurre en cerca del 60% de los casos de CaP, previamente ya mencionada) que aumenta la expresión proteica de *ERG*, y esta a su vez silencia la expresión de *HPGD* a través de la unión con su centro promotor [43]. La baja expresión del gen *HPGD* también puede estar dada por la alta metilación observada en CaP [127]. Finalmente, se ha observado que en líneas tumorales específicas de CaP como C4-2 (CRPC) y LNCaP (respondedora a andrógenos) la expresión de la proteína HPGD se encuentra reprimida [128].

Por otro lado, en un estudio se encontró una alta asociación entre la expresión del gen HPGD con estadios avanzados y metastásicos del CaP, aunque sólo en un subgrupo

específico de pacientes [39]; en otro estudio, realizado en población china con 109 pacientes, se encontró una asociación entre la sobreexpresión del gen HPGD con el riesgo de desarrollo de CaP en pacientes con puntaje alto de Gleason, esto explicado por la presencia del SNP (por sus siglas en inglés, Single Nucleotide Polymorphism) rs8752 del gen HPGD al generar una interrupción en la unión del miR-485-5p al transcripto mRNA de *HPGD* [38]; Sí bien, los resultados de estos dos últimos estudios son contradictorios con respecto a los hallazgos de los estudios descritos en el párrafo anterior, nuestros hallazgos no son concluyentes, al no mostrar diferencias significativas con relación a los desenlaces de RB ni con el riesgo determinado por los GGG. Sin embargo, es importante tener en cuenta que, dentro de las limitaciones de nuestro estudio está el número reducido de muestras y el uso de especímenes en FFPE que no permite la adecuada conservación de ácidos nucleicos, lo que limita la calidad y cantidad de RNA extraído para los ensayos de qRT-PCR.

En cuanto a la expresión proteica de HPGD, en nuestro estudio es de recalcar la expresión diferencial de esta proteína según la región tisular. Una menor frecuencia (28,6%) fue observada en la región intratumoral. Como se explicó previamente, la baja expresión de HPGD puede estar regulada por la expresión ERG que actúa como un factor nuclear de represión sobre el gen *HPGD* [43]. En particular, en nuestro estudio, 61 de los 98 casos expresaron ERG en la región intratumoral, y de estos sólo 8 expresaron HPGD en su mayoría con un bajo nivel (ver anexo B). En contraste, en la región periférica se observó una mayor frecuencia de HPGD (68,4%) asociada con una menor frecuencia de ERG (10,2%). Estos resultados son coherentes con estudios previos donde se encontró una elevada expresión proteica de ERG en tejido tumoral comparado con una baja expresión en tejidos prostáticos normales y tejido adyacente al tumor [129]. Estos hallazgos soportan nuestros resultados y están en línea con el concepto que ERG desregula la expresión de HPGD en pacientes con CaP.

Continuando con este concepto, en nuestro estudio encontramos que el nivel alto de expresión de la proteína se presentó casi exclusivamente en la región tumoral, en su mayoría asociado a una expresión negativa de ERG intratumoral y a no RB, sin embargo, lo llamativo de estos casos (5 pacientes) es su asociación con un riesgo alto por GGG. Dicha asociación también se identificó en el resto de los pacientes que tuvieron una expresión de ERG negativa, los cuales se asociaron con GGG de alto riesgo (ver anexo

b). Nuestros resultados son consistentes con los observados en otros estudios donde los tumores de CaP positivos para ERG se asocian con más frecuencia a bajo grado de Gleason y viceversa [129][130][131]; y también son consistentes con los resultados del estudio previo que indica que la expresión negativa de ERG favorece la expresión de HPGD[43]. Estos resultados sugieren una posible asociación del grado alto de Gleason en estos pacientes con una negatividad de ERG y por lo tanto una expresión alta de HPGD, que por su papel inhibidor de PGE2 (PGE2, asociado a tumorigenesis) favorece un mejor reconocimiento inmunológico antitumoral, lo que en nuestro estudio podría explicar la asociación en los cinco casos con un mejor factor pronóstico para supervivencia libre de RB.

El número de TIL se ha correlacionado con el resultado clínico en una variedad de tumores sólidos, incluidos el melanoma, el cáncer de vejiga, el cáncer colorectal entre otros [132], [133]. En conjunto, estos estudios indican un mejor resultado clínico con recuentos altos de TIL, lo que demuestra un impacto biológico de la respuesta de LT antitumorales en muchos, si no en la mayoría, de los cánceres. Sin embargo, en el CaP la implicación pronóstica de los TIL ha sido controversial. En CaP muchos reportes brindan evidencia de que los subtipos de LT y las LB están presentes en el MAT de próstata y podrían contribuir a la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, se ha mostrado que un aumento en el infiltrado de TIL CD4+, pero no CD8+ se asoció con una reducción de la supervivencia específica del cáncer. [106] [111] [134]. En línea con estos resultados, en nuestro estudio se observó una mayor frecuencia y alta densidad de TIL (CD4 y CD8) comparado con una baja frecuencia e infiltración periférica; esta alta densidad de TIL se caracterizó por una mayor razón de CD4/CD8 con respecto a las regiones periféricas. Adicional, esta mayor infiltración tanto de CD4, como CD8 se asoció con una menor supervivencia libre de RB en pacientes con CaP localmente avanzado.

La importancia pronóstica de los TIL CD8+ en CaP es incierta. Un estudio previo mostró que una alta densidad de TIL CD8+ se asocia con una supervivencia libre de RB más corta [30]. En contraste, otros estudios han reportado una tendencia entre la alta densidad de TIL CD8+ y una mejor supervivencia libre de RB [128], e incluso que después de la terapia neoadyuvante de privación de andrógenos (ADT) un alto número de TIL CD8+ se asocia con una mejor supervivencia general [135]. La asociación entre los linfocitos CD8+ y el mal pronóstico en CaP observado en nuestro estudio puede ser explicado a que los LT pueden

tener capacidades inmunosupresoras. Un estudio reciente de Flammiger et al. indica que una alta densidad TIL FOXP3+ en pacientes con CaP se asocia con un peor resultado clínico, lo que indica que la inmunosupresión y el posterior escape inmunitario del tumor son un mecanismo importante para el desarrollo del CaP ([136]. Desafortunadamente, en nuestro estudio no fue posible evaluar la expresión de FOXP-3 por condiciones técnicas, sin embargo, nosotros observamos una baja expresión de perforinas, lo que indirectamente puede estar indicando una baja actividad de los TIL observados.

La sobreexpresión del oncogén ERG ocurre en cerca del 50% de los casos de CaP localmente avanzado y metastásico debido a un reordenamiento genético que involucra al gen TMPRSS2 regulado por andrógenos con ERG [137]. Previos estudios han encontrado que la expresión elevada de ERG conduce a una disminución de HPGD [43]; HPGD además tiene la capacidad de inhibir la prostaglandina PGE2, que es un actor importante en el microambiente tumoral, donde suprime la inmunidad antitumoral y regula la evasión del reconocimiento inmunológico, lo que lleva a una mayor progresión tumoral [122]. Se ha observado que los tumores con expresión de ERG son biológicamente distintos de los tumores que no expresan ERG con respecto a la activación de la respuesta inmunitaria [138] así, los tumores con expresión de proteína ERG en las glándulas epiteliales tienen un mayor número de células positivas para CD3. Esta correlación posiblemente resulta de una mayor migración de LT hacia tumores que expresan ERG, que se caracterizan por un microambiente proinflamatorio. En concordancia con esto, en nuestro estudio se halló una correlación entre la expresión de ERG y la desregulación de HPGD, donde la mayoría de los tumores ERG positivos presentaron una baja o no expresión de HPGD, sin embargo, no se observó una relación clara en cuánto a la densidad de TIL, ni los desenlaces de RB. En un estudio previo, Petrovics G y col. observaron una asociación entre una mayor expresión de ERG con una mayor supervivencia sin RB posterior a la PR [139], sin embargo, en otro estudio la fusión del gen TMPRSS2-ERG se asoció con un peor pronóstico [140]. Estos resultados indican que la detección de ERG parece ser un marcador de difícil correlación con otros parámetros clínico-patológicos y al igual que lo encontrado en nuestros resultados, los estudios inmunohistoquímicos han demostrado que aunque la densidad de linfocitos aumenta en el cáncer de próstata en comparación con el tejido prostático normal [141], la etiología y la función inmunológica precisa de los infiltrados linfocíticos no es clara aún [111]. En nuestro estudio es de remarcar que la alta frecuencia de expresión de HPGD y la presencia de LT (CD4 y CD8) se ubicaron en

regiones tisulares opuestas, lo que no permite establecer asociaciones entre estos marcadores.

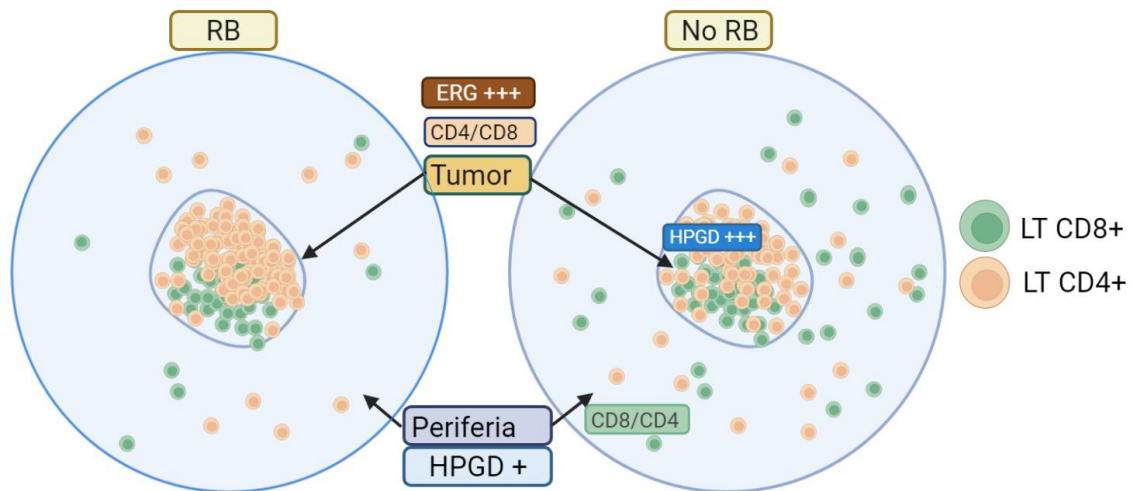
Con respecto al análisis *in silico*, encontramos un contraste en los resultados entre la expresión de genes relacionados con TIL de la base de datos del TCGA y la inmunohistoquímica relacionada con TIL de nuestros pacientes. El análisis *in silico* indica en general una baja a negativa expresión de genes relacionados con TIL y otras poblaciones inmunitarias, mientras que el análisis de inmunohistoquímica indica por lo contrario una alta densidad de TIL. Esta discordancia se podría deber quizás al tipo de muestras, las características genéticas de las poblaciones y/o el material biológico (RNA vs proteína) que se está evaluando.

También es de resaltar que los resultados del análisis *in silico* muestran la sobreexpresión de FOXP3 (gen relacionado con inmunosupresión) en el tumor vs tejido no tumoral; en el contexto de expresión baja de HPGD se presenta una expresión alta de ERG como también la suma de la sobreexpresión de otros genes asociados a inmunorregulación como TGFB-1 y CTLA-4, lo que va en línea con el concepto de la función que tiene la sobreexpresión de PGE2. Finalmente, se observa que en los pacientes con RB hay sobreexpresión de CD163, gen relacionado con un perfil de macrófagos tipo 2 [142] mientras que en los pacientes sin RB hay una sobreexpresión de CD57 que se relaciona con una alta citotoxicidad de LT [143] lo que podría estar indicando un patrón diferencial de comportamiento del MAT.

En resumen, en nuestro estudio observamos un patrón en el comportamiento de los LT y las proteínas ERG y HPGD. El tumor es el sitio de máxima densidad LT con predominio de CD4 y expresión de ERG en el 62% de los casos con un predominio de alta expresión; mientras que en la región periférica (no tumoral) se presentó un predominio de la relación CD8/CD4 asociado a no RB; y se expresó HPGD en el 68% de los casos con un predominio de baja expresión (nivel normal de expresión en tejido prostático normal) (figura 7.1). También, encontramos en concordancia con la literatura que, a menor nivel de Gleason, mayor expresión de ERG y menor riesgo de RB; y a mayor nivel de Gleason, menor o negativa expresión de ERG y mayor riesgo de RB, aunque fue es este último grupo donde se presentó el nivel alto de expresión de HPGD intratumoral asociándose a no RB (figura

7-1). Finalmente, no se pudo establecer una asociación entre la densidad ni la razón TIL CD4/CD8 con los niveles de expresión de HPGD y los desenlaces de RB, en parte por la diferencia del sitio de presentación de esta proteína y de los LT, el número de muestras y el número de marcadores fenotípicos para LT.

Figura 7-1: Niveles de expresión de ERG y HPGD; e infiltración y relación CD4/CD8 según la región tisular y los desenlaces de RB (imagen desarrollada en BioRender.com)



8. Conclusiones

La expresión proteica de ERG se encuentra en un nivel bajo en tejido prostático benigno mientras que en CaP se encuentra elevado en un porcentaje significativo de pacientes.

La escala de Gleason es un factor predictor de RB, pero pacientes con Gleason alto, negativos para ERG y alta expresión de HPGD intratumoral, podría presentar una asociación con menor riesgo de RB.

La expresión génica y proteica de HPGD se encuentra modulada por la expresión de ERG.

La expresión proteica de HPGD se encuentra en bajo nivel en tejido prostático benigno y aún más bajo o negativo en CaP asociado a la expresión alta de ERG.

La densidad de TIL en esta serie de pacientes fue alta y presentó una marcada diferencia con respecto a las regiones no tumorales.

La alta densidad de TIL (CD4 Y CD8) en esta serie de pacientes podría relacionarse con mayor riesgo de RB.

La presencia predominante de CD8 sobre CD4 podría asociarse a mejor pronóstico en CaP localmente avanzado.

Es necesario evaluar la presencia de marcadores exhaustivos o inmunomodulares en tejido tumoral y no tumoral de CaP para evaluar la función de estos LT, y más aún en el subgrupo específico de Gleason alto, ERG negativo y HPGD alto intratumoral.

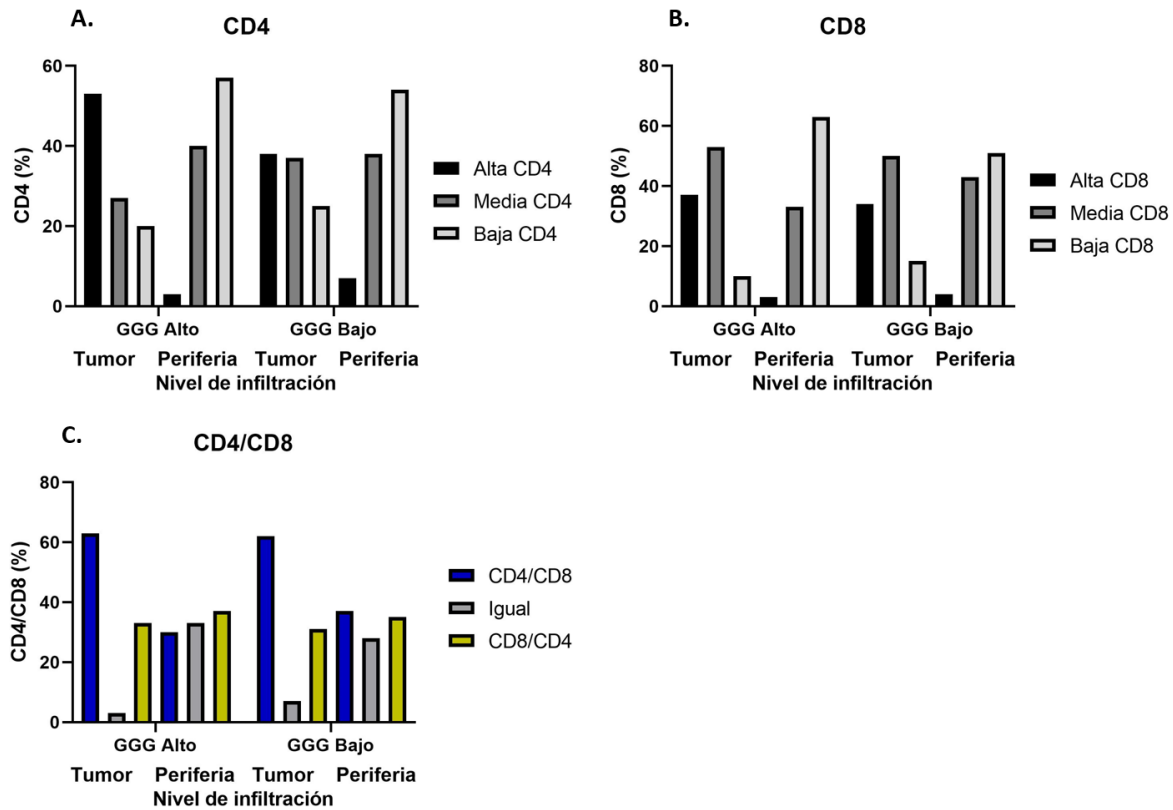
Es necesario evaluar la expresión génica en pacientes con CaP de acuerdo con el estatus de ERG para identificar otras posibles vías relacionadas con este marcador.

9. Recomendaciones

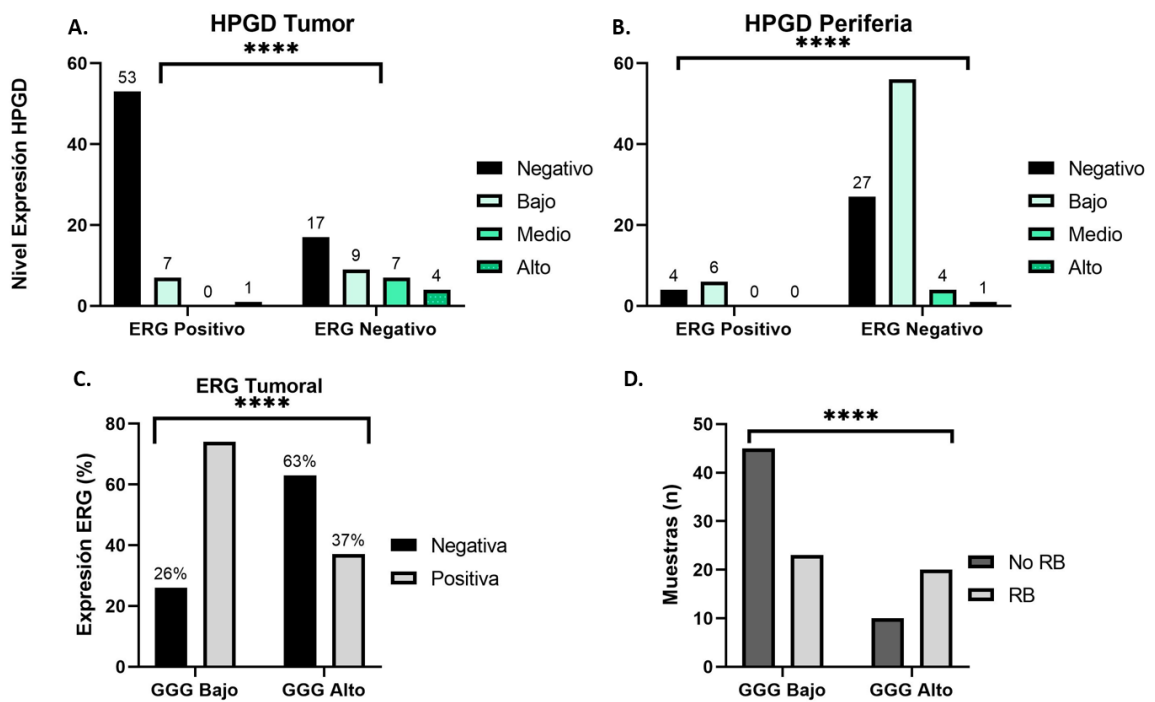
Se plantea que a pesar de que el grado Gleason se relaciona con la expresión de ERG y con los desenlaces de RB de manera independiente; y a su vez la expresión de ERG con la expresión de HPGD, es quizás esta última relación la que podría estar presentando una asociación con el riesgo de RB, aunque tendría que evaluarse con un número poblacional mayor. Además, para evaluar el rol de esta relación con el fenotipo de LT es necesario analizar más componentes inmunológicos tanto linfoides como mieloides de este infiltrado inmunológico.

El análisis de otros componentes tisulares como la presencia de fibroblastos y miofibroblastos asociados al tumor; la producción de factores relacionados con angiogénesis y neovascularización; y el grado de compromiso del tejido nervioso periférico también podría ayudar a comprender y establecer relaciones más claras de determinadas configuraciones del MAT con los desenlaces de RB.

A. Anexo: Infiltración CD4 (A), CD8 (B) y razón CD4/CD8 (C) según el riesgo definido por GGG y región tisular



B. Anexo: niveles de expresión de HPGD según la expresión de ERG en tumor (A) en periferia (B), comportamiento de ERG según los GGG (C) y RB según los GGG (D).



Bibliografía

- [1] H. Sung *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] The Global Cancer Observatory, “GLOBOCAN 2020: International Agency Research on Cancer,” 2020.
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/170-colombia-factsheets.pdf>.
- [3] P. Rawla, “Epidemiology of Prostate Cancer,” vol. 10, no. 2, pp. 63–89, 2019, doi: 10.1159/000423644.
- [4] A. Barsouk *et al.*, “Epidemiology, Staging and Management of Prostate Cancer,” *Med. Sci.*, vol. 8, no. 3, p. 28, 2020, doi: 10.3390/medsci8030028.
- [5] Z. Wang *et al.*, “The efficacy and safety of radical prostatectomy and radiotherapy in high-risk prostate cancer: A systematic review and meta-analysis,” *World Journal of Surgical Oncology*, vol. 18, no. 1. BioMed Central Ltd., Feb. 24, 2020, doi: 10.1186/s12957-020-01824-9.
- [6] X. Zhou *et al.*, “Comparing effectiveness of radical prostatectomy versus external beam radiotherapy in patients with locally advanced prostate cancer: A population-based analysis,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 99, no. 34, p. e21642, 2020, doi: 10.1097/MD.00000000000021642.
- [7] R. Tourinho-Barbosa *et al.*, “Biochemical recurrence after radical prostatectomy: what does it mean?,” doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2016.0656.
- [8] C. L. Amling, E. J. Bergstralh, M. L. Blute, J. M. Slezak, and H. Zincke, “Defining prostate specific antigen progression after radical prostatectomy: What is the most appropriate cut point?,” *J. Urol.*, vol. 165, no. 4, pp. 1146–

- 1151, 2001, doi: 10.1016/S0022-5347(05)66452-X.
- [9] A. I. Cole *et al.*, “Prognostic Value of Percent Gleason Grade 4 at Prostate Biopsy in Predicting Prostatectomy Pathology and Recurrence,” *J. Urol.*, vol. 196, no. 2, pp. 405–411, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.juro.2016.01.120.
- [10] A. V. D’Amico *et al.*, “Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer,” *J. Am. Med. Assoc.*, vol. 280, no. 11, pp. 969–974, Sep. 1998, doi: 10.1001/jama.280.11.969.
- [11] I. M. van Oort, C. A. Hulsbergen-vandeKaa, and J. A. Witjes, “Prognostic Factors in Radical Prostatectomy Specimens: What Do We Need to Know from Pathologists?,” *European Urology, Supplements*, vol. 7, no. 12. Elsevier, pp. 715–722, Nov. 01, 2008, doi: 10.1016/j.eursup.2008.07.002.
- [12] M. N. Simmons, A. J. Stephenson, and E. A. Klein, “Natural History of Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy: Risk Assessment for Secondary Therapy{A figure is presented},” *European Urology*, vol. 51, no. 5. Elsevier, pp. 1175–1184, May 01, 2007, doi: 10.1016/j.eururo.2007.01.015.
- [13] N. Mottet *et al.*, “Highlights on Prostate Cancer from Urological and Oncological Congresses in 2007,” *European Urology, Supplements*, vol. 7, no. 6. Elsevier, pp. 460–476, Apr. 01, 2008, doi: 10.1016/j.eursup.2008.01.004.
- [14] A. Pettersson *et al.*, “The TMPRSS2:ERG rearrangement, ERG expression, and prostate cancer outcomes: A cohort study and meta-analysis,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 21, no. 9, pp. 1497–1509, Sep. 2012, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0042.
- [15] S. A. Tomlins *et al.*, “Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer,” *Science (80-.)*, vol. 310, no. 5748, pp. 644–648, 2005, doi: 10.1126/science.1117679.
- [16] O. Klezovitch *et al.*, “A causal role for ERG in neoplastic transformation of prostate epithelium,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 6, pp. 2105–2110, Feb. 2008, doi: 10.1073/pnas.0711711105.

- [17] S. H. Kim *et al.*, “Overexpression of ERG and wild-type PTEN are associated with favorable clinical prognosis and low biochemical recurrence in prostate cancer,” *PLoS One*, vol. 10, no. 4, Apr. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0122498.
- [18] H. Tai, H. Cho, M. Tong, and Y. Ding, “NAD⁺-Linked 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase: Structure and Biological Functions,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 12, pp. 955–962, 2006.
- [19] S. Jossion, Y. Matsuoka, L. W. K. Chung, H. E. Zhau, and R. Wang, “Tumor-stroma co-evolution in prostate cancer progression and metastasis,” *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 21, no. 1. Elsevier Ltd, pp. 26–32, 2010, doi: 10.1016/j.semcdb.2009.11.016.
- [20] R. D. Schreiber, L. J. Old, and M. J. Smyth, “Cancer immunoediting: Integrating immunity’s roles in cancer suppression and promotion,” *Science*, vol. 331, no. 6024. Science, pp. 1565–1570, Mar. 25, 2011, doi: 10.1126/science.1203486.
- [21] Y. Kuniwa *et al.*, “CD8⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 23, pp. 6947–6958, 2007, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0842.
- [22] L. Schmidleithner *et al.*, “Enzymatic Activity of HPGD in Treg Cells Suppresses Tconv Cells to Maintain Adipose Tissue Homeostasis and Prevent Metabolic Dysfunction,” *Immunity*, vol. 50, no. 5, pp. 1232-1248.e14, 2019, doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.014.
- [23] X. Lin *et al.*, “Assessment of biochemical recurrence of prostate cancer (Review),” *International Journal of Oncology*, vol. 55, no. 6. Spandidos Publications, pp. 1194–1212, Nov. 30, 2019, doi: 10.3892/ijo.2019.4893.
- [24] N. Vitkin, S. Nersesian, D. R. Siemens, and M. Koti, “The tumor immune contexture of prostate cancer,” *Front. Immunol.*, vol. 10, no. MAR, pp. 1–10, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.00603.
- [25] D. Lin, X. Wang, S. Y. C. Choi, X. Ci, X. Dong, and Y. Wang, “Immune phenotypes of prostate cancer cells: Evidence of epithelial immune cell-like transition?,” *Asian J. Urol.*, vol. 3, no. 4, pp. 195–202, 2016, doi:

- 10.1016/j.ajur.2016.08.002.
- [26] W. H. Fridman, L. Zitvogel, C. Sautès-Fridman, and G. Kroemer, "The immune contexture in cancer prognosis and treatment," *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 14, no. 12. Nature Publishing Group, pp. 717–734, Dec. 01, 2017, doi: 10.1038/nrclinonc.2017.101.
- [27] A. M. Miller *et al.*, "CD4 + CD25 high T Cells Are Enriched in the Tumor and Peripheral Blood of Prostate Cancer Patients ," *J. Immunol.*, vol. 177, no. 10, pp. 7398–7405, Nov. 2006, doi: 10.4049/jimmunol.177.10.7398.
- [28] V. Nardone *et al.*, "Tumor infiltrating T lymphocytes expressing FoxP3, CCR7 or PD-1 predict the outcome of prostate cancer patients subjected to salvage radiotherapy after biochemical relapse," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 17, no. 11, pp. 1213–1220, 2016, doi: 10.1080/15384047.2016.1235666.
- [29] F. Petitprez *et al.*, "PD-L1 Expression and CD8 + T-cell Infiltrate are Associated with Clinical Progression in Patients with Node-positive Prostate Cancer," *Eur. Urol. Focus*, vol. 5, no. 2, pp. 192–196, 2019, doi: 10.1016/j.euf.2017.05.013.
- [30] N. Ness *et al.*, "Infiltration of CD8+ lymphocytes is an independent prognostic factor of biochemical failure-free survival in prostate cancer," *Prostate*, vol. 74, no. 14, pp. 1452–1461, 2014, doi: 10.1002/pros.22862.
- [31] J. A. Joyce and D. T. Fearon, "T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment," *Science*, vol. 348, no. 6230. American Association for the Advancement of Science, pp. 74–80, Apr. 03, 2015, doi: 10.1126/science.aaa6204.
- [32] S. Mariathasan *et al.*, "TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells," *Nature*, vol. 554, no. 7693, pp. 544–548, Feb. 2018, doi: 10.1038/nature25501.
- [33] M. Lundholm *et al.*, "Secreted factors from colorectal and prostate cancer cells skew the immune response in opposite directions," *Sci. Rep.*, vol. 5, Oct. 2015, doi: 10.1038/srep15651.
- [34] B. Molon *et al.*, "Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells," *J. Exp. Med.*, vol. 208, no. 10, pp. 1949–1962, Sep.

- 2011, doi: 10.1084/jem.20101956.
- [35] J. A. Taylor *et al.*, “Regulation of the prostaglandin pathway during development of invasive bladder cancer in mice,” *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, vol. 88, no. 1–2, pp. 36–41, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.prostaglandins.2008.09.003.
- [36] J. Heighway *et al.*, “Expression profiling of primary non-small cell lung cancer for target identification,” *Oncogene*, vol. 21, no. 50, pp. 7749–7763, Oct. 2002, doi: 10.1038/sj.onc.1205979.
- [37] R. Wu *et al.*, “Association of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase and poor prognosis of obese breast cancer patients,” 2017. Accessed: May 21, 2020. [Online]. Available: www.impactjournals.com/oncotarget.
- [38] X. Qi, Y. Wang, J. Hou, and Y. Huang, “A single nucleotide polymorphism in HPGD gene is associated with prostate cancer risk,” *J. Cancer*, vol. 8, no. 19, pp. 4083–4086, 2017, doi: 10.7150/jca.22025.
- [39] P. Vainio *et al.*, “Arachidonic acid pathway members PLA2G7, HPGD, EPHX2, and CYP4F8 identified as putative novel therapeutic targets in prostate cancer,” *Am. J. Pathol.*, vol. 178, no. 2, pp. 525–536, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.ajpath.2010.10.002.
- [40] M. Tong and H. H. Tai, “Induction of NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression by androgens in human prostate cancer cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 276, no. 1, pp. 77–81, Sep. 2000, doi: 10.1006/bbrc.2000.3437.
- [41] S. Sun *et al.*, “BAP18 coactivates androgen receptor action and promotes prostate cancer progression,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 17, pp. 8112–8128, 2016, doi: 10.1093/nar/gkw472.
- [42] T. H. Kim, J. M. Park, M. Y. Kim, and Y. H. Ahn, “The role of CREB3L4 in the proliferation of prostate cancer cells,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, Mar. 2017, doi: 10.1038/srep45300.
- [43] A. A. Mohamed *et al.*, “*ERG* oncogene modulates prostaglandin signaling in prostate cancer cells,” *Cancer Biol. Ther.*, vol. 11, no. 4, pp. 410–417, Feb. 2011, doi: 10.4161/cbt.11.4.14180.

- [44] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [45] G. The Global Cancer Observatory, "Prostate 2018," 2019.
- [46] I. de C. en Colombia, "Infocancer Incidencia Próstata Edades." http://www.infocancer.co/portal/#!/filtro_tasas/.
- [47] E. B. O'Keefe, J. P. Meltzer, and T. N. Bethea, "Health Disparities and Cancer: Racial Disparities in Cancer Mortality in the United States, 2000–2010," *Front. Public Heal.*, vol. 3, no. April, pp. 1–15, 2015, doi: 10.3389/fpubh.2015.00051.
- [48] G. K. Panigrahi *et al.*, "Exosome proteomic analyses identify inflammatory phenotype and novel biomarkers in African American prostate cancer patients," *Cancer Med.*, vol. 8, no. 3, pp. 1110–1123, 2019, doi: 10.1002/cam4.1885.
- [49] I. J. Powell, C. H. Bock, J. J. Ruterbusch, and W. Sakr, "Evidence Supports a Faster Growth Rate and/or Earlier Transformation to Clinically Significant Prostate Cancer in Black Than in White American Men, and Influences Racial Progression and Mortality Disparity," *J. Urol.*, vol. 183, no. 5, pp. 1792–1797, May 2010, doi: 10.1016/j.juro.2010.01.015.
- [50] S. D. Brookman-May *et al.*, "Latest Evidence on the Impact of Smoking, Sports, and Sexual Activity as Modifiable Lifestyle Risk Factors for Prostate Cancer Incidence, Recurrence, and Progression: A Systematic Review of the Literature by the European Association of Urology Section of," *Eur. Urol. Focus*, vol. 5, no. 5, pp. 756–787, 2019, doi: 10.1016/j.euf.2018.02.007.
- [51] E. Giovannucci, Y. Liu, E. A. Platz, M. J. Stampfer, and W. C. Willett, "Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study NIH Public Access," 2007.
- [52] F. Islami, D. M. Moreira, P. Boffetta, and S. J. Freedland, "A Systematic Review and Meta-analysis of Tobacco Use and Prostate Cancer Mortality

- and Incidence in Prospective Cohort Studies HHS Public Access,” *Eur Urol*, vol. 66, no. 6, pp. 1054–1064, 2014, doi: 10.1016/j.eururo.2014.08.059.
- [53] J. M. Genkinger *et al.*, “Measures of body fatness and height in early and mid-to-late adulthood and prostate cancer: risk and mortality in The Pooling Project of Prospective Studies of Diet and Cancer,” *Ann. Oncol.*, vol. 31, no. 1, pp. 103–114, 2020, doi: 10.1016/j.annonc.2019.09.007.
- [54] N. Shah and V. Ioffe, “The Association Between Hypertension and Prostate Cancer,” *Rev. Urol.*, vol. 19, no. 2, pp. 113–118, 2017, doi: 10.3909/riu0758.
- [55] Z. Liang *et al.*, “Hypertension and risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis OPEN,” 2016, doi: 10.1038/srep31358.
- [56] Y. C. Chen, J. H. Page, R. Chen, and E. Giovannucci, “Family history of prostate and breast cancer and the risk of prostate cancer in the PSA era,” *Prostate*, vol. 68, no. 14, pp. 1582–1591, 2008, doi: 10.1002/pros.20825.
- [57] O. Bratt, L. Drevin, O. Akre, H. Garmo, and P. Stattin, “Family History and Probability of Prostate Cancer, Differentiated by Risk Category: A Nationwide Population-Based Study,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 108, no. 10, pp. 1–7, 2016, doi: 10.1093/jnci/djw110.
- [58] C. H. Lee, O. Akin-Olugbade, and A. Kirschenbaum, “Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology,” *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, vol. 40, no. 3, pp. 565–575, 2011, doi: 10.1016/j.ecl.2011.05.012.
- [59] K. H. Hammerich, G. E. Ayala, and T. M. Wheeler, “Anatomy of the prostate gland and surgical pathology of prostate cancer,” in *Prostate Cancer*, Cambridge University Press, 2008, pp. 1–14.
- [60] E. Shtivelman, T. M. Beer, and C. P. Evans, “Oncotarget 7217 www.impactjournals.com/oncotarget Molecular pathways and targets in prostate cancer,” 2014. Accessed: May 14, 2020. [Online]. Available: www.impactjournals.com/oncotarget/.
- [61] P. Y. Tan, C. W. Chang, K. R. Chng, K. D. S. A. Wansa, W.-K. Sung, and E. Cheung, “Integration of Regulatory Networks by NKX3-1 Promotes Androgen-Dependent Prostate Cancer Survival,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 32, no.

- 2, pp. 399–414, Jan. 2012, doi: 10.1128/mcb.05958-11.
- [62] S. A. Tomlins *et al.*, “Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer,” *Nature*, vol. 448, no. 7153, pp. 595–599, 2007, doi: 10.1038/nature06024.
- [63] M. J. Linja and T. Visakorpi, “Alterations of androgen receptor in prostate cancer,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 92, no. 4, pp. 255–264, 2004, doi: 10.1016/j.jsbmb.2004.10.012.
- [64] P. Lonergan and D. Tindall, “Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression,” *J. Carcinog.*, vol. 10, 2011, doi: 10.4103/1477-3163.83937.
- [65] M. E. Grossmann, H. Huang, and D. J. Tindall, “Androgen Receptor Signaling in Androgen-Refractory Prostate Cancer.” Accessed: May 15, 2020. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/jnci/article-abstract/93/22/1687/2519589>.
- [66] J. Seidenfeld *et al.*, “Single-therapy androgen suppression in men with advanced prostate cancer: A systematic review and meta-analysis,” *Annals of Internal Medicine*, vol. 132, no. 7. American College of Physicians, pp. 566–577, Apr. 04, 2000, doi: 10.7326/0003-4819-132-7-200004040-00009.
- [67] P. Koivisto *et al.*, “Androgen receptor gene amplification: A possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer,” *Cancer Res.*, vol. 57, no. 2, pp. 314–319, 1997.
- [68] P. A. Koivisto and I. Rantala, “Amplification of the androgen receptor gene is associated with P53 mutation in hormone-refractory recurrent prostate cancer,” *J. Pathol.*, vol. 187, no. 2, pp. 237–241, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199901)187:2<237::AID-PATH224>3.0.CO;2-I.
- [69] M. E. Taplin *et al.*, “Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 332, no. 21, pp. 1393–1398, May 1995, doi: 10.1056/NEJM199505253322101.
- [70] M. J. McPhaul, “Mechanisms of prostate cancer progression to androgen independence,” *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 22, no. 2. pp. 373–388, Apr. 2008, doi:

- 10.1016/j.beem.2008.02.006.
- [71] S. Araki *et al.*, "Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 14, pp. 6854–6862, Jul. 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1162.
- [72] Z. Culig *et al.*, "Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-1, keratinocyte growth factor and epidermal growth factor," *Eur. Urol.*, vol. 54, no. 20, pp. 5474–5478, 1994, doi: 10.1159/000475232.
- [73] A. Hobisch *et al.*, "Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor," *Cancer Res.*, vol. 58, no. 20, pp. 4640–4645, Oct. 1998.
- [74] O. L. Soo, E. Pinder, Y. C. Jae, W. Lou, M. Sun, and A. C. Gao, "Interleukin-4 stimulates androgen-independent growth in LNCaP human prostate cancer cells," *Prostate*, vol. 68, no. 1, pp. 85–91, Jan. 2008, doi: 10.1002/pros.20691.
- [75] G. J. Wise, V. K. Marella, G. Talluri, and D. Shirazian, "Cytokine variations in patients with hormone treated prostate cancer," *J. Urol.*, vol. 164, no. 3 I, pp. 722–725, 2000, doi: 10.1097/00005392-200009010-00024.
- [76] V. M. Velonas, H. H. Woo, C. G. Dos Remedios, and S. J. Assinder, "Current Status of Biomarkers for Prostate Cancer," *Int. J. Mol. Sci*, vol. 14, pp. 11034–11060, 2013, doi: 10.3390/ijms140611034.
- [77] J. I. Epstein, L. Egevad, M. B. Amin, B. Delahunt, J. R. Srigley, and P. A. Humphrey, "The 2014 international society of urological pathology (ISUP) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma definition of grading patterns and proposal for a new grading system," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 40, no. 2, pp. 244–252, 2016, doi: 10.1097/PAS.0000000000000530.
- [78] N. Lawrentschuk, G. Trottier, C. Kuk, and A. Zlotta, "Role of surgery in high-risk localized prostate cancer," vol. 17, no. 2, pp. 25–32, 2010.
- [79] A. J. Hayden, C. Catton, and T. Pickles, "Radiation therapy in prostate cancer: A risk-adapted strategy," *Curr. Oncol.*, vol. 17, no. SUPPL. 2, p.

- S18, 2010, doi: 10.3747/co.v17i0.704.
- [80] M. A. Perlmutter and H. Lepor, "Androgen deprivation therapy in the treatment of advanced prostate cancer.," *Rev. Urol.*, vol. 9 Suppl 1, no. Suppl 1, pp. S3-8, 2007, Accessed: May 15, 2020. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17387371>.
- [81] F. Z. Chen and X. K. Zhao, "Prostate cancer: Current treatment and prevention strategies," *Iranian Red Crescent Medical Journal*, vol. 15, no. 4. Iranian Red Crescent Society, pp. 279–284, 2013, doi: 10.5812/ircmj.6499.
- [82] Y. Lotan and C. G. Roehrborn, "Clearance rates of total prostate specific antigen (PSA) after radical prostatectomy in African-Americans and Caucasians," *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, vol. 5, no. 2, pp. 111–114, Jun. 2002, doi: 10.1038/sj.pcan.4500567.
- [83] O. Yossepowitch *et al.*, "Positive surgical margins after radical prostatectomy: A systematic review and contemporary update," *European Urology*, vol. 65, no. 2. Elsevier, pp. 303–313, Feb. 01, 2014, doi: 10.1016/j.eururo.2013.07.039.
- [84] P. H. Lange, C. J. Ercole, D. J. Lightner, E. E. Fraley, and R. Vessella, "The value of serum prostate specific antigen determinations before and after radical prostatectomy," *J. Urol.*, vol. 141, no. 4 I, pp. 873–879, Apr. 1989, doi: 10.1016/S0022-5347(17)41037-8.
- [85] D. A. Leach and G. Buchanan, "Stromal androgen receptor in prostate cancer development and progression," *Cancers (Basel)*, vol. 9, no. 1, pp. 1–24, 2017, doi: 10.3390/cancers9010010.
- [86] P. G. Corn, "The tumor microenvironment in prostate cancer: elucidating molecular pathways for therapy development," *Cancer Manag. Res.*, vol. 4, pp. 183–193, 2012, doi: 10.2147/CMAR.S32839.
- [87] D. A. Leach *et al.*, "Stromal androgen receptor regulates the composition of the microenvironment to influence prostate cancer outcome," *Oncotarget*, vol. 6, no. 18, pp. 16135–16150, 2015, doi: 10.18632/oncotarget.3873.
- [88] S. L. Shiao, G. C.-Y. Chu, and L. W. K. Chung, "Regulation of Prostate Cancer Progression by the Tumor Microenvironment," *Cancer Lett.*, vol.

- 380, no. 1, pp. 340–348, 2016, doi: 0.1016/j.canlet.2015.12.022.
- [89] D. W. Powell, R. C. Mifflin, J. D. Valentich, S. E. Crowe, J. I. Saada, and A. B. West, “Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease,” *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, vol. 277, no. 1 46-1. American Physiological Society Bethesda, MD , 1999, doi: 10.1152/ajpcell.1999.277.1.c1.
- [90] A. Desmouliere, C. Guyot, and G. Gabbiani, “The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior,” *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 48, no. 5–6, pp. 509–517, Sep. 2004, doi: 10.1387/ijdb.041802ad.
- [91] J. A. Tuxhorn, G. E. Ayala, and D. R. Rowley, “Reactive stroma in prostate cancer progression,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 8, no. 9, pp. 2912–2923, 2002, doi: 10.1016/S0022-5347(05)65620-0.
- [92] B. Bagalad, K. Mohan Kumar, and H. Puneeth, “Myofibroblasts: Master of disguise,” *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, vol. 21, no. 3. Medknow Publications, pp. 462–463, Sep. 01, 2017, doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_146_15.
- [93] S. Hendry *et al.*, “Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasi,” *Advances in Anatomic Pathology*, vol. 24, no. 5. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 235–251, 2017, doi: 10.1097/PAP.000000000000162.
- [94] K. S. Sfanos, S. Yegnasubramanian, W. G. Nelson, and A. M. De Marzo, “The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development,” *Nat. Rev. Urol.*, vol. 15, no. 1, pp. 11–24, 2018, doi: 10.1038/nrurol.2017.167.
- [95] A. M. De Marzo and Elizabeth A. Platz, “Inflammation in prostate carcinogenesis,” *Nat Rev Cancer*, vol. 7, no. 4, pp. 256–269, 2007, doi: 10.1038/nrc2090.
- [96] R. S. Mani, Mohammad A. Amin, X. Li, and S. Kalyana-Sundaram, “Inflammation induced oxidative stress mediates gene fusion formation in

- prostate cancer,” *Cell Rep*, vol. 17, no. 10, pp. 2620–2631, 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.019.
- [97] G. J. L. H. Van Leenders *et al.*, “Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy,” *Am. J. Pathol.*, vol. 162, no. 5, pp. 1529–1537, 2003, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64286-1.
- [98] W. H. Fridman, F. Pagès, C. Sauts-Fridman, and J. Galon, “The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 12, no. 4. Nat Rev Cancer, pp. 298–306, Apr. 2012, doi: 10.1038/nrc3245.
- [99] J. Galon *et al.*, “Towards the introduction of the ‘Immunoscore’ in the classification of malignant tumours,” *J. Pathol.*, vol. 232, no. 2, pp. 199–209, 2014, doi: 10.1002/path.4287.
- [100] M. Capone *et al.*, “Immunoscore: a new possible approach for melanoma classification,” *J. Immunother. Cancer*, vol. 2, no. S3, pp. 2–3, 2014, doi: 10.1186/2051-1426-2-s3-p193.
- [101] I. F. Lissbrant, P. Stattin, P. Wikstrom, J. E. Damber, L. Egevad, and A. Bergh, “Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival.,” *Int. J. Oncol.*, vol. 17, no. 3, pp. 445–451, 2000, doi: 10.3892/ijo.17.3.445.
- [102] W. Wang, A. Bergh, and J. E. Damber, “Cyclooxygenase-2 expression correlates with local chronic inflammation and tumor neovascularization in human prostate cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 9, pp. 3250–3256, 2005, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2405.
- [103] N. Nonomura *et al.*, “Infiltration of tumour-associated macrophages in prostate biopsy specimens is predictive of disease progression after hormonal therapy for prostate cancer,” *BJU Int.*, vol. 107, no. 12, pp. 1918–1922, 2011, doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09804.x.
- [104] E. Richardsen, R. D. Uglehus, J. Due, C. Busch, and L. T. R. Busund, “The prognostic impact of M-CSF, CSF-1 receptor, CD68 and CD3 in prostatic carcinoma,” *Histopathology*, vol. 53, no. 1, pp. 30–38, 2008, doi:

- 10.1111/j.1365-2559.2008.03058.x.
- [105] J. Irani *et al.*, “High-grade inflammation in prostate cancer as a prognostic factor for biochemical recurrence after radical prostatectomy,” *Urology*, vol. 54, no. 3, pp. 467–472, 1999, doi: 10.1016/S0090-4295(99)00152-1.
- [106] P. A. McArdle, K. Canna, D. C. McMillan, A. H. McNicol, R. Campbell, and M. A. Underwood, “The relationship between T-lymphocyte subset infiltration and survival in patients with prostate cancer,” *Br. J. Cancer*, vol. 91, no. 3, pp. 541–543, 2004, doi: 10.1038/sj.bjc.6601943.
- [107] M. Lanciotti *et al.*, “The role of M1 and M2 macrophages in prostate cancer in relation to extracapsular tumor extension and biochemical recurrence after radical prostatectomy,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/486798.
- [108] K. S. Sfanos, T. C. Bruno, A. K. Meeker, A. M. De Marzo, W. B. Isaacs, and C. G. Drake, “Human prostate-infiltrating CD8+ T lymphocytes are oligoclonal and PD-1+,” *Prostate*, vol. 69, no. 15, pp. 1694–1703, 2009, doi: 10.1002/pros.21020.
- [109] S. Davidsson *et al.*, “CD4 helper T cells, CD8 cytotoxic T cells, and FOXP3 + regulatory T cells with respect to lethal prostate cancer,” *Mod. Pathol.*, vol. 26, no. 3, pp. 448–455, 2013, doi: 10.1038/modpathol.2012.164.
- [110] J. Woo *et al.*, “Mp49-03 Tumor Infiltrating B-Cells Are Increased in Prostate Cancer Tissue,” *J. Urol.*, vol. 191, no. 4S, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1016/j.juro.2014.02.1104.
- [111] A. Flammiger *et al.*, “Intratatumoral T but not B lymphocytes are related to clinical outcome in prostate cancer,” *Apmis*, vol. 120, no. 11, pp. 901–908, 2012, doi: 10.1111/j.1600-0463.2012.02924.x.
- [112] V. Kärjä, S. Aaltomaa, P. Lipponen, T. Isotalo, M. Talja, and R. Mokka, “Tumour-infiltrating lymphocytes: A prognostic factor of psa-free survival in patients with local prostate carcinoma treated by radical prostatectomy,” *Anticancer Res.*, vol. 25, no. 6 C, pp. 4435–4438, 2005.
- [113] H. A. Hempel *et al.*, “Low Intratumoral Mast Cells Are Associated With a Higher Risk of Prostate Cancer Recurrence,” *Prostate*, vol. 77, no. 4, pp.

- 412–424, 2017, doi: 10.1002/pros.23280.
- [114] B. Gurel *et al.*, “Chronic inflammation in benign prostate tissue is associated with high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 23, no. 5, pp. 847–856, 2014, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-1126.
- [115] R. Kennedy, “Multiple roles for CD4 T cells in anti-tumor immune responses_KennedyCelisImmRev08.pdf,” *Immunol. Rev.*, vol. 222, pp. 129–144, 2008.
- [116] M. Beyer and J. L. Schultze, “Regulatory T cells in cancer,” *Blood*, vol. 108, no. 3, pp. 804–811, 2006, doi: 10.1182/blood-2006-02-002774.
- [117] T. F. Gajewski, H. Schreiber, and Y. X. Fu, “Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment,” *Nature Immunology*, vol. 14, no. 10. NIH Public Access, pp. 1014–1022, 2013, doi: 10.1038/ni.2703.
- [118] K. S. Sfanos *et al.*, “Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals T H17 and Treg skewing,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 11, pp. 3254–3261, 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5164.
- [119] B. Samuelsson, R. Morgenstern, and P. J. Jakobsson, “Membrane prostaglandin E synthase-1: A novel therapeutic target,” *Pharmacological Reviews*, vol. 59, no. 3. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, pp. 207–224, Sep. 01, 2007, doi: 10.1124/pr.59.3.1.
- [120] A. Madrigal-Martínez, V. Constâncio, F. J. Lucio-Cazaña, and A. B. Fernández-Martínez, “PROSTAGLANDIN E 2 stimulates cancer-related phenotypes in prostate cancer PC3 cells through cyclooxygenase-2,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, no. 5, pp. 7548–7559, May 2019, doi: 10.1002/jcp.27515.
- [121] K. Yoshimatsu *et al.*, “Inducible microsomal prostaglandin E synthase is overexpressed in colorectal adenomas and cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 7, no. 12, pp. 3971–3976, Dec. 2001.
- [122] F. Finetti, C. Travelli, J. Ercoli, G. Colombo, E. Buoso, and L. Trabalzini, “Prostaglandin E2 and cancer: Insight into tumor progression and immunity,” *Biology (Basel)*, vol. 9, no. 12, pp. 1–26, 2020, doi:

- 10.3390/biology9120434.
- [123] R. Parra-Medina and S. Ramírez-Clavijo, “Why not to use punch biopsies in formalin-fixed paraffin-embedded samples of prostate cancer tissue for DNA and RNA extraction?,” *African J. Urol.*, vol. 27, no. 1, 2021, doi: 10.1186/s12301-021-00257-4.
- [124] L. Collado-Torres *et al.*, “Reproducible RNA-seq analysis using recount2,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 35, no. 4, pp. 319–321, Apr. 2017, doi: 10.1038/nbt.3838.
- [125] E. Afgan *et al.*, “The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. W1, pp. W3–W10, Jul. 2016, doi: 10.1093/nar/gkw343.
- [126] TheHumanProteinAtlas:HPGD, “Tissue expression of HPGD - The Human Protein Atlas,” *Tissue expression of HPD The Human Protein Atlas*. [Online]. Available: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000164120-HPGD/tissue>.
- [127] D. Lodygin, A. Epanchintsev, A. Menssen, J. Diebold, and H. Hermeking, “Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer,” *Cancer Res.*, vol. 65, no. 10, pp. 4218–4227, 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4407.
- [128] H. T. Purayil, Y. Zhang, J. B. Black, R. Gharaibeh, and Y. Daaka, “Nuclear β Arrestin1 regulates androgen receptor function in castration resistant prostate cancer,” *Oncogene*, vol. 40, no. 14, pp. 2610–2620, 2021, doi: 10.1038/s41388-021-01730-8.
- [129] H. Liu, J. Shi, M. Wilkerson, X. J. Yang, and F. Lin, “Immunohistochemical evaluation of ERG expression in various benign and malignant tissues,” *Ann. Clin. Lab. Sci.*, vol. 43, no. 1, pp. 3–9, 2013.
- [130] J. Baohong, J. Sedarsky, S. Srivastava, I. Sesterhenn, A. Dobi, and L. Quanlin, “ERG tumor type is less frequent in high grade and high stage prostate cancers of Chinese men,” *J. Cancer*, vol. 10, no. 9, pp. 1991–1996, 2019, doi: 10.7150/jca.30025.
- [131] A. D. Darnel, C. J. LaFargue, R. T. Vollmer, J. Corcos, and T. A. Bismar,

- “TMPRSS2-ERG fusion is frequently observed in gleason pattern 3 prostate cancer in a canadian cohort,” *Cancer Biol. Ther.*, vol. 8, no. 2, pp. 125–130, 2009, doi: 10.4161/cbt.8.2.7134.
- [132] J. Galon *et al.*, “Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome,” *Science (80-.)*, vol. 313, no. 5795, pp. 1960–1964, Sep. 2006, doi: 10.1126/science.1129139.
- [133] M. J. M. Gooden, G. H. de Bock, N. Leffers, T. Daemen, and H. W. Nijman, “The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis,” *Br. J. Cancer*, vol. 105, no. 1, pp. 93–103, Jun. 2011, doi: 10.1038/bjc.2011.189.
- [134] K. Ebel *et al.*, “Dominance of CD4+ lymphocytic infiltrates with disturbed effector cell characteristics in the tumor microenvironment of prostate carcinoma,” *Prostate*, vol. 68, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2008, doi: 10.1002/pros.20661.
- [135] C. Sorrentino, P. Musiani, P. Pompa, G. Cipollone, and E. Di Carlo, “Androgen Deprivation Boosts Prostatic Infiltration of Cytotoxic and Regulatory T Lymphocytes and Has No Effect on Disease-Free Survival in Prostate Cancer Patients,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 6, pp. 1571–1581, Mar. 2011, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2804.
- [136] A. Flammiger *et al.*, “High tissue density of FOXP3+ T cells is associated with clinical outcome in prostate cancer,” *Eur. J. Cancer*, vol. 49, no. 6, pp. 1273–1279, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.ejca.2012.11.035.
- [137] K. Park *et al.*, “Antibody-Based Detection of ERG Rearrangement-Positive Prostate Cancer,” *Neoplasia*, vol. 12, no. 7, pp. 590-IN21, Jul. 2010, doi: 10.1593/neo.10726.
- [138] A. Flammiger *et al.*, “Intratumoral T but not B lymphocytes are related to clinical outcome in prostate cancer,” *APMIS*, vol. 120, no. 11, pp. 901–908, Nov. 2012, doi: 10.1111/j.1600-0463.2012.02924.x.
- [139] G. Petrovics *et al.*, “Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome,” *Oncogene*, vol. 24, no. 23, pp. 3847–3852, May 2005, doi: 10.1038/sj.onc.1208518.

- [140] R. K. Nam *et al.*, “Expression of the TMPRSS2:ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer,” *Br. J. Cancer*, vol. 97, no. 12, pp. 1690–1695, Dec. 2007, doi: 10.1038/sj.bjc.6604054.
- [141] A. VALDMAN *et al.*, “Distribution of Foxp3-, CD4- and CD8-positive lymphocytic cells in benign and malignant prostate tissue,” *APMIS*, vol. 118, no. 5, pp. 360–365, May 2010, doi: 10.1111/j.1600-0463.2010.02604.x.
- [142] M. H. M. Barros, F. Hauck, J. H. Dreyer, B. Kempkes, and G. Niedobitek, “Macrophage Polarisation: an Immunohistochemical Approach for Identifying M1 and M2 Macrophages,” *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e80908, Nov. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0080908.
- [143] H. Kared, S. Martelli, T. P. Ng, S. L. F. Pender, and A. Larbi, “CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 65, no. 4, pp. 441–452, Apr. 2016, doi: 10.1007/s00262-016-1803-z.