**TÍTULO:** Evaluación de la Expresión Inmunohistoquímica de Proteínas Relacionadas al Ciclo Celular en Carcinomas Escamosos Peneanos Mediante Análisis Digital de Imágenes con Paquetes Informáticos Libres

**AUTORES:** Anahí M. de Chaux,1 Alcides Chaux1,2

**AFILIACIÓN ACADÉMICA:** 1Dirección de Investigación y Divulgación Científica, Universidad del Norte (Asunción, Paraguay); 2Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica, CEDIC (Asunción, Paraguay)

**CORRESPONDENCIA:** Dr. Alcides Chaux, Dirección de Investigación y Divulgación Científica, Universidad del Norte, Gral. Santos e/ 25 de mayo, Asunción, Paraguay. +595 (021) 203-108. [achaux@gmail.com](mailto:achaux@gmail.com)

RESUMEN

**INTRODUCCIÓN**

El cáncer de pene es un tumor infrecuente en países desarrollados de Norteamérica y Europa, representando, sin embargo, un serio problema de salud pública en países en vías de desarrollo.(Siegel, Miller, and Jemal 2015; Bleeker et al. 2009) La incidencia es particularmente alta en países como Brasil y Paraguay, donde las tasas son de hasta 4 veces mayores a las observadas en países del primer mundo.(Chaux et al. 2013) No existen explicaciones satisfactorias para estas variaciones geográficas, pero factores de riesgo tales como la falta de circuncisión, fimosis, tabaquismo, antecedentes de desgarros peneanos, enfermedades inflamatorias crónicas, pobre higiene genital, y ciertas infecciones virales podrían tener alguna influencia en las regiones con mayor incidencia.(Chaux et al. 2013; Bleeker et al. 2009) La mayoría de los cánceres peneanos son carcinomas escamosos, reconociéndose un variado espectro de subtipos histológicos distintos, cada uno con características clínico-patológicas y pronósticos particulares.(Chaux and Cubilla 2012b) El desarrollo del cáncer de pene sigue una vía patogénica bimodal, una asociada con la infección por el virus del papiloma humano (HPV) y otra independiente de la infección viral.(Chaux and Cubilla 2012a)

A pesar de que el cáncer de pene es más frecuentemente una enfermedad loco-regional, se observa diseminación sistémica y metástasis a distancia en hasta el 40% de los pacientes. En este contexto, la muerte por cáncer diseminado aparece habitualmente dentro de los 2 a 3 años del diagnóstico inicial.(Pizzocaro et al. 2010) Mientras que la cirugía y la radioterapia son las opciones de elección en pacientes con tumores localizados, la quimioterapia es la opción principal para aquellos con enfermedad diseminada. Desafortunadamente, las tasas de respuesta al tratamiento quimioterapéutico están lejos de ser aceptables.(Sonpavde et al. 2013) Por lo tanto, se requieren de otros enfoques, especialmente aquellos que involucran el uso de terapias dirigidas.(Gerber 2008)

Las terapias dirigidas han cambiado significativamente el tratamiento del cáncer durante los últimos 10 años. Al involucrar mecanismos de acción distintos a los de la quimioterapia citotóxica tradicional, suelen ser mejor toleradas, asociándose con menos efectos secundarios adversos. Estos fármacos son parte hoy en día del tratamiento de muchos tumores malignos.(Gerber 2008) Sin embargo, no existen protocolos de tratamiento dirigido para pacientes con cáncer de pene diseminado, principalmente por dos razones. La primera está relacionada con la rareza de estos tumores en países desarrollados en los que estos fármacos están en evaluación o aprobados para su uso clínico. La segunda se relaciona con la escasez de reportes de investigación estudiando la biología molecular del cáncer de pene, buscando identificar alteraciones en vías metabólicas que sean de interés para el desarrollo de terapias dirigidas.

El propósito del presente estudio es evaluar la expresión inmunohistoquímica de diversas proteínas involucradas en el control del ciclo celular en tumores peneanos mediante análisis digital de imágenes. Se compararán los valores de expresión obtenidos mediante inspección visual y estimación digital, y se evaluará la asociación entre los niveles de expresión, las características histopatológicas y la presencia de HPV. La hipótesis básica de trabajo es que existen alteraciones específicas de vías metabólicas particulares en las células tumorales del carcinoma escamoso que son evidenciables de una forma más objetiva mediante el análisis digital de imágenes. Asimismo, existen correlaciones entre las expresiones inmunohistoquímicas de ciertas proteínas relacionadas al ciclo celular y las características morfológicas del tumor, lo que sugeriría mecanismos oncogénicos particulares y posiblemente blancos terapéuticos específicos.

**MATERIAL Y MÉTODO**

**Selección de casos y procesamiento de tejidos**

Se evaluaron los niveles de expresión inmunohistoquímica de 4 proteínas relacionadas con el ciclo celular (p53, Ki67, ciclina D1 y MDM2) en 113 muestras tisulares de carcinomas escamosos. Las muestras tisulares fueron obtenidas de los casos de consulta del Investigador Principal y consistieron en tejido tumoral fijado en formol al 10% y embebido en parafina. A partir de estas muestras tisulares se confeccionaron 4 microarrays tisulares (TMA, por sus siglas en inglés, *tissue microarray*) en el TMA Lab Core de la Johns Hopkins University (Baltimore, MD), siguiendo un protocolo previamente publicado.(Fedor and De Marzo 2005)

**Evaluación morfológica**

A partir de estos bloques de TMA se obtuvieron cortes tisulares que fueron teñidos con hematoxilina y eosina (HE).

**Inmunohistoquímica**

Las tinciones inmunohistoquímicas fueron llevadas a cabo en sistemas automatizados de Ventana (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) o Leica-Bond (Leica, Bannonckburn, IL). La Tabla 1 indica los anticuerpos primarios, el método de recuperación antigénica, y la fuente de los anticuerpos utilizados.

The reaction was developed using the Streptavidin-HRP detection i-View kit (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), polymer detection (Leica, Bannockburn, IL), or the EnVision Plus Poly-HRP Immunohistochemical Detection System (DAKO, Carpinteria, CA) • All sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated, and coverslipped.

**Evaluación de la expresión inmunohistoquímica**

La medición se realiza visualmente y mediante análisis digital de imágenes. Posteriormente se analizan estos niveles de expresión, evaluando su rol en la alteración del ciclo celular de las células tumorales y su asociación con características morfológicas del tumor. Este proceso requerirá el uso intensivo de herramientas de ciencias de datos tales como R/RStudio, ImageJ, MarkDown, y similares.

El uso de estos TMA para investigación fue aprobado por el Institutional Board Review (IBR) de la Johns Hopkins University (Baltimore, MD).

El Proyecto estará dividido en 5 fases: diagnóstico de las lesiones tumorales, evaluación de microarrays tisulares, confección de la base de datos, análisis estadístico, y redacción del informe de investigación. Estas fases se describen a continuación.

\*\*1) Diagnóstico de las lesiones tumorales:\*\* Primeramente se procede a la clasificación de los 4 TMA disponibles conteniendo muestras tisulares de los casos de cáncer de pene. Se identifican las láminas histológicas completas correspondientes a estos casos y se procede a la clasificación histopatológica de las lesiones tumorales, usando criterios previamente establecidos.[@Chaux2010b; @Chaux2012] Esta evaluación se realiza sobre muestras tisulares teñidas con hematoxilina & eosina.

\*\*2) Evaluación de microarrays tisulares:\*\* Una vez que todas las lesiones tumorales han sido clasificadas se procede a la evaluación visual de la expresión inmunohistoquímica de proteínas relacionadas con el ciclo celular. Esta evaluación se lleva a cabo en un microscopio Zeiss AxioLab 2. Se estima visualmente los niveles de expresión utilizando una escala semicuantitativa previamente desarrollada y validada.[@Chaux2013b] Tras la evaluación visual se procede a digitalizar los TMA, utilizando una técnica previamente descrita.[@Chaux2014a] Posteriormente se procede al análisis de las imágenes utilizando un protocolo de análisis digital previamente desarrollado y publicado.[@Chaux2013a]

\*\*3) Confección de la base de datos:\*\* Tras la recolección de datos visuales y digitales se confecciona una base de datos en la que consigna toda la información recolectada hasta el momento, incluyendo los datos histopatológicos y la evaluación visual y digital de cada uno de los casos de cáncer de pene. Esta base de datos está disponible gratuitamente para todos los investigadores a través de este repositorio.

\*\*4) Análisis estadístico:\*\* Se procede al análisis estadístico de los datos. El análisis de datos se realiza utilizando el lenguaje de programación R.[@RCoreTeam] A través de este repositorio, se publica el código del análisis estadístico.

\*\*5) Redacción de informes de investigación:\*\* Como fase final se redacta el informe de investigación reportando los resultados del proyecto.

RESULTADOS

DISCUSIÓN

REFERENCIAS