

Alcides Chauz
Dirección de Investigación y Divulgación Científica
Universidad del Norte
Rev UN Med 2015 4(1): 159-187

Expresión inmunohistoquímica de la vía del blanco de rapamicina en mamíferos en carcinomas escamosos del pene: Un estudio de 112 casos usando microarrays tisulares, con implicancias para terapias dirigidas

RESUMEN

Antecedentes: El cáncer de pene es un tumor infrecuente en países desarrollados de Norteamérica y Europa pero frecuente en otras regiones del mundo como Sudamérica, África, y Asia. Los índices de cáncer de pene son particularmente altos en países como Brasil y Paraguay, con incidencias hasta 4 veces mayores que en los países desarrollados. Actualmente, no se cuentan con opciones terapéuticas consensuadas y validadas para pacientes con tumores diseminados. Por el otro lado, se han descrito alteraciones la vía del blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR, por sus siglas en inglés: "mammalian target of rapamycin") en varios tumores malignos, lo que resulta de interés clínico dada la existencia de inhibidores específicos de la vía del mTOR. Sin embargo, la vía del mTOR no ha sido suficientemente evaluada en carcinomas peneanos. Objetivos: Evaluar la expresión inmunohistoquímica de biomarcadores que forman parte de la vía del mTOR en carcinomas peneanos, y evaluar la asociación con el subtipo histológico, grado histológico, e infección por el virus del papiloma humano (HPV, por sus siglas en inglés: "human papillomavirus"). Materiales y métodos: Se construyeron 4 microarrays tisulares (TMA, por sus siglas en inglés: "tissue microarray") utilizando 112 casos de carcinomas escamosos invasivos del pene. Se evaluó la expresión inmunohistoquímica de los siguientes marcadores: PTEN, p-AKT, p-mTOR, y p-S6. Resultados: Se detectó disminución o pérdida de la expresión de PTEN en 87% de los casos. Los carcinomas condilomatosos y/o basaloides presentaron una mayor proporción de pérdida de PTEN ($P = 0.02$) mientras que los carcinomas queratinizantes mostraron niveles mayores de p-S6 ($P = 0.009$). Los niveles de p-AKT y de p-mTOR no fueron significativamente diferentes entre los carcinomas condilomatosos/basaloides y los carcinomas queratinizantes ($P = 0.75$ y $P = 0.77$, respectivamente). PTEN no se asoció con el grado histológico ($P = 0.18$). Los niveles de expresión de p-S6 fueron significativamente mayores en tumores de bajo grado ($P = 0.001$) mientras que los niveles de expresión de p-AKT y p-mTOR fueron ligeramente mayores en tumores de alto grado ($P = 0.01$ y $P = 0.35$, respectivamente). No se detectó asociación significativa entre la presencia de infección por HPV y los biomarcadores evaluados ($P \geq 0.2$ en todos los casos). Conclusiones: Estos resultados proveen evidencia de una alteración en la vía del mTOR en carcinomas escamosos del pene, independiente de la infección por HPV. La expresión de PTEN estuvo frecuentemente disminuida y no se asoció con el grado histológico. Los niveles de p-S6 fueron significativamente mayores en tumores de bajo grado, mientras que los niveles de p-AKT y p-mTOR fueron ligeramente mayores en tumores de alto grado. Este estudio provee de bases para la evaluación más exhaustiva de inhibidores de la vía del mTOR (v.g., everolimus, temsirolimus) en pacientes con cáncer de pene diseminado, tumor que presenta una alta incidencia en países como Brasil y Paraguay.

Palabras claves: cáncer de pene; carcinoma escamoso; blanco de rapamicina en mamíferos; virus del papiloma humano; PTEN; mTOR.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pene es un tumor infrecuente en países desarrollados de Norteamérica y Europa. Sin embargo,

este tumor representa un serio problema de salud pública en África, Asia y Sudamérica (Siegel, Miller, y Jemal). La incidencia es particularmente alta en países como Brasil y Paraguay, donde las tasas son de hasta

4 veces mayores a la observadas en países del primer mundo (Ferlay et al.). 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, Netto, et al.).

La mayoría de los cánceres peneanos son carcinomas escamosos, reconociéndose un variado espectro de 12 subtipos histológicos distintos, cada uno con características clinicopatológicas y pronósticas particulares (Chaux y Cubilla). Al igual que lo que ocurre con los carcinomas vulvares y los de cabeza y cuello el desarrollo del cáncer de pene sigue una vía patogénica bimodal, una asociada con la infección por el virus del papiloma humano (HPV, por sus siglas en inglés: "human papillomavirus") y otra independiente de la infección viral. La infección por HPV se ha asociado con el desarrollo de carcinomas escamosos en aproximadamente la mitad de los casos (Cubilla et al.). 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.). 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.). Por lo tanto, se requieren de otros enfoques, especialmente aquellos que involucran el uso de terapias dirigidas (Gerber).

Las terapias dirigidas, que incluyen anticuerpos monoclonales e inhibidores moleculares pequeños, han cambiado significativamente el tratamiento del cáncer durante los últimos 10 años. Las terapias dirigidas, al involucrar mecanismos de acción distintos a los de la quimioterapia citotóxica tradicional, suelen ser mejor tolerados, asociándose con menos efectos secundarios adversos. Estos fármacos son parte hoy en día del tratamiento de muchos tumores malignos, incluyendo cánceres de mama, colon-recto, pulmón, y páncreas, así como de linfomas, leucemias, y mielomas múltiples (Gerber). 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 tu-

morens 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.

Dentro de las vías metabólicas que con más interés se han estado evaluado en el contexto de posibles terapias dirigidas se encuentra la vía del blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR, por sus siglas en inglés: "mammalian target of rapamycin"). La vía del mTOR juega un papel central en la regulación del crecimiento celular y participa del control de numerosos procesos celulares, incluyendo la iniciación de la transcripción del ARNm y la traducción proteica. El primer miembro de la vía es PI3K, el que puede ser directamente activado mediante receptores de tirosina-quinasa, lo que conduce a la fosforilación de AKT. A su vez, la activación de AKT está negativamente controlada por PTEN. AKT fosforilado (p-AKT) ejerce sus efectos "cuesta abajo" mediante la fosforilación de ya sean proteínas relacionadas con los genes de la esclerosis tuberosa (*TSC1/TSC2*) o sobre un substrato de AKT rico en prolina (PRAS40). Un complejo sensible a la rapamicina (mTORC1) es entonces fosforilado por cualquiera de estas proteínas, lo que a su vez activa dos vías de señalización "cuesta abajo", S6 y 4EBP1. La forma activada de 4EBP1 (p-4EBP1) se disocia de eIF4E, permitiendo que éste último forme un complejo que facilita la traducción de proteínas relacionadas al ciclo celular (v.g., c-MYC y ciclina-D1) y factores inducidos por hipoxia (v.g., HIF-1 α). Por el otro lado, la activación de S6 (p-S6) conduce en última instancia a la traducción de proteínas y biogénesis ribosomal.

Alteraciones en la vía del mTOR se han observado en varios tumores sólidos, incluyendo tumores de las vías genitourinarias (Knowles et al.; Chaux, Compérat, et al.; Qian et al.; Garcia y Danielpour). La utilidad de los inhibidores del mTOR de primera generación (v.g., everolimus, temsirolimus) en el tratamiento de pacientes con carcinoma diseminado de células renales ya ha sido firmemente establecida (Garcia y Danielpour). Actualmente, inhibidores del mTOR de segunda generación han también entrado ya a la arena clínica para su evaluación (Engelman). Sin embargo, los datos sobre la expresión de la vía del mTOR en el cáncer de pene se limitan a sólo algunos estudios aislados (Ferrandiz-Pulido et al.; Stankiewicz et al.). Más aún, no existen ensayos clínicos registrados ni en la base de datos de los U.S. *National Health Institutes* (<http://clinicaltrials.gov>) ni en la *International Clinical*

Trials Registry Platform de la Organización Mundial de la Salud (<http://www.who.int/ictrp>) evaluando la utilidad de inhibidores del mTOR en pacientes con cáncer de pene.

Tomando en cuenta los puntos previamente establecidos se ha diseñado la presente investigación con el fin de evaluar el estado de la vía del mTOR mediante inmunohistoquímica en una muestra grande de pacientes con cáncer de pene, provenientes de una región de alta incidencia (Paraguay). Los objetivos de la presente investigación son determinar la expresión inmunohistoquímica de miembros claves de la vía del mTOR en carcinomas penianos, evaluando la interrelación y asociación con el subtipo histológico, grado histológico, e infección por HPV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de Pacientes, Construcción de Microarrays Tisulares, Evaluación Morfológica, y Detección de HPV

El presente estudio incluye muestras tisulares de 112 pacientes con carcinoma escamoso invasivo del pene que fueron diagnosticados en el Instituto de Patología e Investigación (Asunción, Paraguay) entre los años 2000 y 2011. Los casos correspondieron a especímenes quirúrgicos de penectomías parciales o totales en los que las muestras de tejido fueron fijadas en formol al 10% e incluidas en parafina. De cada caso se seleccionaron 1–4 bloques en los que la representación del tejido tumoral era significativa. Utilizando estos bloques se construyeron 4 microarrays tisulares (TMA, por sus siglas en inglés: “tissue microarrays”) en el Johns Hopkins TMA Lab Core (Baltimore, MD), utilizando un procedimiento previamente descrito (Fedor y De Marzo). Por cada bloque se obtuvieron 3 cilindros tisulares de 1 mm cada uno de las áreas tumorales, brindando una representación de 3–12 cilindros tumorales por caso.

La clasificación por subtipos histológicos se llevó a cabo en cortes completos de tejidos utilizando criterios morfológicos previamente descritos (Chaux and Cubilla). La distribución por subtipos histológicos fue como sigue: carcinoma escamoso usual, 48 casos; carcinoma condilomatoso-basaloides, 24 casos; carcinoma condilomatoso, 17 casos; carcinoma basaloides, 11 casos; carcinoma papilar, 9 casos; carcinoma verrucoso, 2 casos; y carcinoma sarcomatoide, 1 caso. Los carcinomas basaloides, condilomatosos, y condilomatoso-basaloides (52 casos) fueron agrupados como “carcinomas con características condilomatosas/basaloides”.

La asignación de grados histológicos se realizó en cada cilindro de TMA utilizando criterios previamente publicados y validados. Los carcinomas escamosos de grado 1 y grado 2 fueron clasificados como tumores de bajo grado mientras que los carcinomas de grado 3 fueron clasificados como tumores de alto grado. Para los análisis estadísticos el más alto grado histológico de los cilindros tisulares fue utilizado como representativo del caso.

En 52 casos se realizó la detección de HPV mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: “polymerase chain reaction”) con SPF10 utilizando DEIA, un ADN inmunoensayo para la detección general de HPV, según un protocolo descrito previamente (Cubilla et al.). Como controles de la reacción se utilizaron muestras tisulares (5% del total) en las que la presencia de HPV no era esperable.

Inmunohistoquímica y Sistema de Puntuación

Se realizó inmunohistoquímica para las siguientes proteínas: PTEN, p-AKT, p-mTOR, and p-S6. Las tinciones se realizaron en cortes de tejido fijados con formol y embebidos en parafina utilizando el PowerVision PolyHRP IHC Detection System (Leica Microsystems, Bannockburn, IL). Los cortes fueron deparafinados, rehidratados, y sometidos a recuperación de antígenos inducida por calor en una solución tamponada utilizando un vaporizador. Los cortes fueron luego incubados con el anticuerpo primario apropiado, según se especifica a continuación: PTEN, clon D4.3, dilución 1:100; p-AKT, clon 736E11 (sitio de fosforilación en Ser⁴⁷³), dilución 1:50; p-mTOR, clon 49F9, dilución 1:50; y p-S6, anticuerpo policlonal (sitio de fosforilación en Ser^{240/244}), dilución 1:2000. Todos los anticuerpos fueron adquiridos de Cell Signaling (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA). Tras la aplicación de un anticuerpo poli-HRP secundario anti-conejo o anti-ratón las láminas fueron incubadas utilizando 3-3' diaminobencidina como cromógeno y contrateñidas con hematoxilina. Líneas celulares apropiadas fueron utilizadas como controles externos, y los controles internos fueron evaluados para la expresión inmunohistoquímica positiva y negativa, según se ha descrito previamente (Schultz et al.; Lotan et al.).

Cada cilindro de TMA fue escaneado utilizando el sistema APERIO (Aperio Technologies, Inc., Vista, CA) y subido a TMAJ, una plataforma de acceso gratuito (disponible en <http://tmaj.pathology.jhmi.edu>) para la evaluación online de las imágenes de los TMA. Las imágenes fueron escaneadas a una resolución de 20x, brindando una imagen a escala de 2.65 micrones/mm. A partir de los 4 TMA fueron escaneados

732 cilindros, los que fueron evaluados en la pantalla de una computadora personal.

La expresión de PTEN fue estimada utilizando criterios previamente descritos (Schultz et al.). Brevemente, cada cilindro de TMA fue evaluado independientemente y clasificado en una de las siguientes categorías: 1) expresión normal de PTEN; 2) expresión disminuida de PTEN; 3) pérdida de expresión de PTEN. Si todos los cilindros mostraron expresión normal de PTEN el caso fue clasificado como "PTEN normal". Si todos los cilindros mostraron pérdida de expresión de PTEN el caso fue clasificado como "PTEN perdido". En todas las otras instancias el caso fue clasificado como "PTEN disminuido".

Para la evaluación de p-AKT, p-mTOR, y p-S6 el porcentaje de células positivas (tinción nuclear para p-AKT y p-mTOR y tinción citoplásmica para p-S6) fue estimado cilindro por cilindro. Cualquier intensidad de tinción fue considerada como positiva. Para los análisis estadísticos se utilizó la mediana ponderada de las células positivas de cada caso.

Análisis Estadísticos

La expresión de los biomarcadores se comparó contra el subtipo histológico, grado histológico, y estado de HPV. Para las categorías de expresión de PTEN se utilizó la prueba exacta de Fisher. Para los porcentajes de p-AKT, p-mTOR, y p-S6 se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para el rango de igualdad de poblaciones. La prueba de Cuzick para la tendencia a través de grupos ordenados se utilizó como un complemento a la prueba de Kruskal-Wallis. Para controlar las tasas de error por familia (4 variables evaluadas simultáneamente) el nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ se ajustó utilizando la corrección de Šidák a $P < 0.01$ con dos colas de distribución. Los datos fueron analizados utilizando Stata/SE 12.0 (StataCorp LP, College Station, TX).

RESULTADOS

La Tabla 1 resume los resultados de los niveles de expresión de PTEN, p-AKT, p-mTOR, y p-S6 con respecto al subtipo histológico, grado histológico, y estado de HPV. Los patrones de expresión inmunohistoquímica de estos biomarcadores se muestra en la Figura 1 (PTEN) y Figura 2 (p-AKT, p-mTOR, y p-S6).

Expresión de Biomarcadores por Subtipos Histológicos

La expresión de PTEN fue normal en 13 casos (12%), disminuida en 84 casos (75%), y se perdió en 15 casos (13%). Aunque los subtipos histológicos no se aso-

ciación con la expresión de PTEN independientemente (P de Fisher = 0.14) los tumores con características condilomatosas/basaloides presentaron una proporción mayor de pérdida de PTEN que los tumores sin estas características (23% vs. 5%, P de Fisher = 0.02), comparados con las otras categorías de expresión de PTEN. Las diferencias en la proporción de tumores con y sin características condilomatosas/basaloides no fueron significativamente diferentes (P de Fisher = 0.46) en los casos con expresión disminuida de PTEN (40% vs. 60%) y con expresión normal de PTEN (46% vs. 54%).

Los subtipos histológicos no se asociaron independientemente con los niveles de expresión de p-AKT (P de Kruskal-Wallis = 0.36), p-mTOR (P de Kruskal-Wallis = 0.95) o p-S6 (P de Kruskal-Wallis = 0.11). Cuando los tumores fueron agrupados, los niveles de p-AKT y p-mTOR no fueron significativamente diferentes dependiendo de la presencia o ausencia de características condilomatosas/basaloides (P de Kruskal-Wallis = 0.75 y 0.77, respectivamente). Sin embargo, los tumores sin características condilomatosas/basaloides mostraron un porcentaje medio mayor de células p-S6 positivas (50%) comparado con tumores con características condilomatosas/basaloides (18%) y la diferencia fue estadísticamente significativa (P de Kruskal-Wallis = 0.009).

Expresión de Biomarcadores por Grados Histológicos

La distribución por grados histológicos fue como sigue: tumores de bajo grado, 46 casos (41%); tumores de alto grado, 66 casos (59%). El grado histológico se asoció significativamente con la presencia de características condilomatosas/basaloides (P de Fisher < 0.001), con el 79% de los carcinomas condilomatosos/basaloides mostrando algo grado histológico contra 42% de tumores sin características condilomatosas/basaloides.

La Tabla 1 muestra los niveles de expresión de PTEN, p-AKT, p-mTOR, y p-S6 por grados histológicos. Brevemente, PTEN y p-AKT no se asociaron significativamente con el grado histológico, aunque en el último se observaron porcentajes mayores de células positivas en tumores de alto grado histológico (P de Cuzick = 0.16). Los porcentajes de células p-mTOR positivas también fueron mayores en tumores de alto grado histológico (P de Cuzick = 0.01). Los incrementos en porcentajes fueron similares en valores absolutos a los observados para p-AKT. La tendencia opuesta fue observada para p-S6, con un menor porcentaje de células p-S6 positivas en tumores de alto grado (P de Cuzick = 0.001).

Expresión de Biomarcadores por Estado de HPV

De las 52 muestras analizadas se encontró HPV en 20 casos (39%). El estado de HPV se asoció significativamente con el subtipo histológico: 65% de los tumores HPV positivos mostraron características condilomatosas/basaloides mientras sólo el 31% de los carcinomas condilomatosos/basaloides fueron HPV negativos (P de Fisher = 0.02). El estado de HPV también se asoció significativamente con el grado histológico: 85% de los tumores HPV positivos fueron de alto grado mientras que sólo el 47% de los tumores HPV negativos fueron de alto grado (P de Fisher = 0.008).

La Tabla 1 muestra la asociación entre el estado de HPV y la expresión de biomarcadores. Brevemente, el estado de HPV no se asoció con la expresión de PTEN, p-AKT, p-mTOR, o p-S6.

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la expresión inmunohistoquímica de miembros de la vía del mTOR, incluyendo PTEN, p-AKT, p-mTOR, and p-S6, en 112 casos de carcinomas escamosos del pene. Los hallazgos sugieren que la disminución de la expresión de PTEN es un evento común (75% de los casos) en carcinomas peneanos, con pérdida de la expresión de PTEN en 13% de los casos. En general, los niveles de expresión de p-mTOR y p-AKT fueron bajos, con porcentajes mayores de células p-S6 positivas. También se observó una tendencia de pérdida de expresión de PTEN en tumores con características condilomatosas/basaloides (i.e., carcinoma condilomatoso, carcinoma basaloides, y carcinoma condilomatoso-basaloides). Al contrario, tumores sin características condilomatosas/basaloides (carcinoma usual, carcinoma papilar, carcinoma verrucoso, y carcinoma sarcomatoide) mostraron una expresión mayor de p-S6. Sin embargo, los niveles de expresión de los biomarcadores estudiados no difirieron significativamente dependiendo del estado de HPV, sugiriendo que la activación de la vía del mTOR ocurre independientemente de la infección por HPV. Además, la expresión de PTEN no se asoció con el grado histológico, mientras que se observaron ligeros incrementos en la expresión inmunohistoquímica para p-AKT y p-mTOR con grados histológicos crecientes. A pesar de estos hallazgos, los porcentajes crudos de células positivas fueron bajos para p-AKT y p-mTOR (hasta el 10%) y los incrementos fueron pequeños en valores absolutos. Finalmente, se observó una asociación fuerte e inversa entre la expresión de p-S6 y los grados histológicos, con una tendencia positiva para tumores de

bajo grado. Tomando en cuenta todos estos hallazgos, estos resultados indican una activación de la vía del mTOR en carcinomas escamosos, principalmente a través de la inactivación de PTEN y la activación de p-S6.

La activación de la vía del mTOR usualmente es el resultado de la inactivación del gen supresor de tumores *PTEN*. Recientemente se ha descrito que la pérdida de expresión inmunohistoquímica de PTEN en el cáncer de próstata se asocia en la mayoría de los casos con la pérdida genómica de *PTEN* (Lotan et al.). Queda aún por determinar si es que las mismas alteraciones genéticas son las responsables de la pérdida de la expresión de PTEN en el cáncer de pene. En un estudio previo Anderson y col. investigaron el estado mutacional de *PTEN* en 28 carcinomas peneanos y no encontraron mutaciones en los puntos calientes (exones 5 al 8) examinados (Andersson et al.). En otro estudio, Stankiewicz y col. evaluaron el estado de PTEN por inmunohistoquímica y por hibridación *in situ* por inmunofluorescencia en pacientes con cáncer de pene (Stankiewicz et al.). Estos investigadores encontraron expresión inmunohistoquímica disminuida o pérdida de PTEN en el 62% de los casos pero pérdida del número de copias génicas de *PTEN* en sólo el 4% de los casos. Pareciera ser que, a diferencia de lo que se observa en el cáncer de próstata, en el cáncer de pene la disminución o pérdida de la expresión inmunohistoquímica de PTEN no se asocia frecuentemente con la pérdida génica de *PTEN*. Estudios futuros deberán evaluar si además de la pérdida génica otros mecanismos de inactivación de *PTEN* están involucrados en la patogénesis del cáncer de pene.

Con respecto a la asociación entre el subtipo histológico y la activación de la vía del mTOR, a pesar de que se encontró una asociación entre las características condilomatosas/basaloides, PTEN, y p-S6, ninguna de estas asociaciones permaneció significativa una vez que el estado de HPV se tuvo en cuenta. Por lo tanto, a pesar de pudieran existir diferencias dependiendo del subtipo histológico, pareciera que la activación de la vía del mTOR no es afectada por la infección por HPV, como lo indican éste y otros estudios (Molinolo et al.; Stankiewicz et al.). Sin embargo, algunos reportes recientes afirman que la activación de la vía del mTOR es más frecuentemente observada en carcinomas peneanos HPV negativos (Ferrandiz-Pulido et al.). Claramente, se requieren estudios adicionales para dilucidar la controversia con respecto a la asociación entre la infección por HPV y la activación de la vía del mTOR.

Con respecto a la asociación entre el grado histológico y la activación de la vía del mTOR, no se encontraron asociaciones significativas entre el grado histológico y PTEN y p-AKT, una asociación marginalmente significativa con p-mTOR, y una fuerte (e inversa) asociación con p-S6. Dos estudios previos han evaluado la expresión de biomarcadores de la vía del mTOR en carcinomas penianos en relación con el grado histológico. En el estudio de Stankiewicz y col. PTEN pero no p-AKT (expresión nuclear) se asoció con el grado histológico (Stankiewicz et al.), mientras que en el estudio de Ferrandiz-Pulido y col. p-mTOR no se asoció con el grado histológico (Ferrandiz-Pulido et al.). Las diferencias entre estos estudios previos y los resultados del presente estudio pueden explicarse tomando en cuenta diferencias en los protocolos de inmunohistoquímica, sistemas de puntuación, y el uso de criterios morfológicos distintos para la gradación histológica. Además, la presente investigación es la primera en reportar la asociación entre p-S6 y el grado histológico en cáncer de pene. La asociación significativa que se observó entre estos miembros "cuesta abajo" de la vía del mTOR y el grado histológico sugiere que la activación de esta vía participa de alguna manera en la oncogénesis y progresión tumoral de los carcinomas penianos. Sobre este tema, los resultados observados con respecto a la expresión de p-S6 son algo intrigantes, considerando la asociación inversa entre p-S6 y el grado histológico. Teniendo en cuenta que la activación de S6 es catalizada por p-mTOR se podría esperar que ambos biomarcadores muestren niveles similares de expresión. Los resultados de esta investigación sugieren que en los carcinomas podría haber una vía alternativa de regulación de S6 aparte de la vía del mTOR, como se ha demostrado para 4EBP1 (otro miembro "cuesta abajo" de la vía del mTOR) en los carcinomas uroteliales (Nawroth et al.).

Se ha reportado una asociación entre la expresión de mTOR y el pronóstico para varios tumores, incluyendo cánceres de esófago, glándulas salivales, hígado, estómago, mama, vías biliares, vejiga urinaria, y cáncer de pulmón. Se ha reportado también que una expresión mayor de mTOR se correlaciona con un pronóstico peor en carcinomas escamosos de cabeza y cuello, una enfermedad similar en su patología al cáncer de pene (Monteiro et al.). Considerando la fuerte asociación que se observó en el presente estudio entre p-S6 y el grado histológico, el valor pronóstico de la expresión de p-S6 en el cáncer de pene debería asimismo evaluarse. Recientemente, Ferrandiz-Pulido y col. evaluaron la vía del mTOR en 67 pacientes con cáncer de pene y encontraron que la sobreexpresión de

p-mTOR se asoció con el desarrollo de metástasis a ganglios linfáticos (Ferrandiz-Pulido et al.). Claramente, se necesita investigar más el papel de la vía del mTOR como un factor pronóstico en los carcinomas escamosos del pene. Más aún, además de su valor putativo como un pronosticador clínico, los resultados de la presente investigación sugieren que los inhibidores de la vía del mTOR podrían ser beneficiosos en pacientes con cáncer de pene diseminado.

Dos limitaciones deben ser reconocidas en el presente estudio. Primero, la ausencia de información de seguimiento de los pacientes. Segundo, el uso de TMA en vez de cortes completos de tejidos. Con respecto a la primera, esta limitación está determinada por la naturaleza de la base de datos, dado que los casos fueron seleccionados de un centro privado de referencia en el cual habitualmente no se realiza seguimiento de los pacientes. El objetivo del presente estudio fue el obtener una muestra razonablemente grande de carcinomas penianos con el fin de determinar el perfil inmunohistoquímico de la vía del mTOR en estos tumores. Ahora que éste y otros estudios han establecido que la activación de la vía del mTOR sucede en el cáncer de pene, las investigaciones futuras deberán estar orientadas a incorporar más datos clínicos dentro de este marco teórico. Con respecto a la segunda limitación, referida al uso de TMA en vez de cortes completos, se reconoce que la heterogeneidad en el tinte de algunos biomarcadores podría tener algún impacto en la evaluación de los niveles de expresión. Sin embargo, varios estudios han dado apoyo al valor del TMA en la evaluación inmunohistoquímica de marcados así como a la adecuada representación de los niveles de expresión global mediante la utilización de múltiples cilindros de TMA con muestras de tejido normal y tumoral (Camp, Neumeister, y Rimm). Más aún, la utilización de la técnica del TMA ayuda a eliminar la variabilidad interexperimental debido a que cientos de casos pueden ser teñidos en condiciones similares.

CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación proveen evidencia de la existencia de alteraciones en la vía del mTOR en los carcinomas escamosos del pene, independientes de la infección por HPV. La expresión de PTEN estuvo frecuentemente disminuida, con pérdida de la expresión de PTEN en 13% de los casos. Los niveles de PTEN no se asociaron con el grado histológico. Los niveles de expresión de p-S6 fueron signi-

ficativamente mayores en tumores de bajo grado mientras que los niveles de expresión de p-AKT y p-mTOR fueron ligeramente mayores en tumores de alto grado. Estos resultados dan apoyo a la noción de que los inhibidores de la vía del mTOR podrían ser clínicamente beneficiosos en pacientes con carcinomas penianos diseminados.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. George J. Netto de la Johns Hopkins University (Baltimore, MD) por el apoyo brindado durante la construcción de los TMA y la realización de las tinciones inmunohistoquímicas.

TRABAJOS CITADOS

- Andersson, Patiyan et al. "PIK3CA, HRAS and KRAS Gene Mutations in Human Penile Cancer." *The Journal of urology* 179.5 (2008): 2030–4. Impreso.
- Camp, Robert L, Veronique Neumeister, and David L Rimm. "A Decade of Tissue Microarrays: Progress in the Discovery and Validation of Cancer Biomarkers." *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26.34 (2008): 5630–7. Impreso.
- Chaux, Alcides, George J Netto, et al. "Epidemiologic Profile, Sexual History, Pathologic Features, and Human Papillomavirus Status of 103 Patients with Penile Carcinoma." *World Journal of Urology* 31.4 (2013): 861–867. Impreso.
- Chaux, Alcides, Eva Comp erat, et al. "High Levels of Phosphatase and Tensin Homolog Expression Are Associated with Tumor Progression, Tumor Recurrence, and Systemic Metastases in pt1 Urothelial Carcinoma of the Bladder: A Tissue Microarray Study of 156 Patients Treated by Transurethral Resect." *Urology* 81 (2013): 116–122. Impreso.
- Chaux, Alcides, and Antonio L Cubilla. "Advances in the Pathology of Penile Carcinomas." *Human Pathology* 43.6 (2012): 771–789. Impreso.
- Cubilla, Antonio L et al. "The Basaloid Cell Is the Best Tissue Marker for Human Papillomavirus in Invasive Penile Squamous Cell Carcinoma: A Study of 202 Cases from Paraguay." *The American Journal of Surgical Pathology* 34.1 (2010): 104–14. Impreso.
- Engelman, Jeffrey A. "Targeting PI3K Signalling in Cancer: Opportunities, Challenges and Limitations." *Nature Reviews Cancer* 9.8 (2009): 550–62. Impreso.
- Fedor, Helen L, and Angelo M De Marzo. "Practical Methods for Tissue Microarray Construction." *Methods in Molecular Medicine* 103 (2005): 89–101. Impreso.
- Ferlay, J et al. *GLOBOCAN (2008) Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2010. Impreso.
- Ferrandiz-Pulido, Carla et al. "mTOR Signaling Pathway in Penile Squamous Cell Carcinoma: pmTOR and pElF4E over Expression Correlate with Aggressive Tumor Behavior." *The Journal of Urology* 190.6 (2013): 2288–95. Impreso.
- Garcia, J. A., and D. Danielpour. "Mammalian Target of Rapamycin Inhibition as a Therapeutic Strategy in the Management of Urologic Malignancies." *Molecular Cancer Therapeutics* 7.6 (2008): 1347–1354. Impreso.
- Gerber, David E. "Targeted Therapies: A New Generation of Cancer Treatments." *American Family Physician* (2008): 311–319. Impreso.
- Knowles, Margaret A et al. "Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Pathway Activation in Bladder Cancer." *Cancer and Metastasis Reviews* 2009: 305–316. Impreso.
- Lotan, T. L. et al. "PTEN Protein Loss by Immunostaining: Analytic Validation and Prognostic Indicator for a High Risk Surgical Cohort of Prostate Cancer Patients." *Clinical Cancer Research* 17.20 (2011): 6563–6573. Impreso.
- Molinolo, A. A. et al. "mTOR as a Molecular Target in HPV-Associated Oral and Cervical Squamous Carcinomas." *Clinical Cancer Research* 18.9 (2012): 2558–2568. Impreso.
- Monteiro, Luís Silva et al. "Phosphorylated Mammalian Target of Rapamycin Is Associated with an Adverse Outcome in Oral Squamous Cell Carcinoma." *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 115.5 (2013): 638–45. Impreso.
- Nawroth, Roman et al. "S6K1 and 4E-BP1 Are Independent Regulated and Control Cellular Growth in Bladder Cancer." Ed. Irina Agoulnik. *PLoS ONE* 6.11 (2011): e27509. Impreso.
- Pizzocaro, Giorgio et al. "EAU Penile Cancer Guidelines 2009." *European urology* 57.6 (2010): 1002–1012. Impreso.
- Qian, Chao Nan et al. "Activation of the PI3K/AKT Pathway Induces Urothelial Carcinoma of the Renal Pelvis: Identification in Human Tumors and Confirmation in Animal Models." *Cancer Research* 69.21 (2009): 8256–8264. Impreso.
- Schultz, Luciana et al. "Immunoexpression Status and Prognostic Value of mTOR and Hypoxia-Induced Pathway Members in Primary and Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinomas." *The American Journal of Surgical Pathology* 35.10 (2011): 1549–1556. Impreso.

- Siegel, Rebecca L, Kimberly D Miller, and Ahmedin Jemal. "Cancer Statistics, 2015." *CA Cancer J. Clin.* 65.1 (2015): 5–29. Impreso.
- Sonpavde, G et al. "Penile Cancer: Current Therapy and Future Directions." *Annals of Oncology* (2013): 1179–1189. Impreso.
- Stankiewicz, Elzbieta et al. "Alternative HER/PTEN/Akt Pathway Activation in HPV Positive and Negative Penile Carcinomas." *PloS one* 6.3 (2011): e17517. Web. Impreso.