

11213
1
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios de Postgrado
Instituto Mexicano del Seguro Social
Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional "La Raza"

EXPRESION DE LOS RECEPTORES PARA FACTOR DE CRECIMIENTO
EPIDERMICO (EGF-R) EN MUESTRAS DE HIPERPLASIA PROSTATICA
BENIGNA EN HUMANOS MEDIANTE EL EMPLEO DE ESTUDIOS DE
COMPETENCIA CON RADIOLIGANDOS

T E S I S

Que para obtener el Título en la Especialidad de
ENDOCRINOLOGIA Y NUTRICION

p r e s e n t a

DR. NACU AUREO CARACAS PORTILLA

Asesores: Dr. David González Bárcena
Dr. Manuel Vadillo Buenfil



IMSS

México, D.F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

372017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MÉDICO LA RAZA

**EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES PARA FACTOR DE
CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF-R) EN MUESTRAS DE
HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA EN HUMANOS
MEDIANTE EL EMPLEO DE ESTUDIOS DE COMPETENCIA
CON RADIOLIGANDOS**

ASESORES:

Dr. David González Bárcena

Jefe del Departamento Clínico de Endocrinología

Dr. Manuel Vadillo Buenfil

Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica

PRESENTA:

Dr. Nacú Aureo Caracas Portilla

HOJA DE FIRMAS



hospital de especialidades

Dr. Arturo Robles Páramo

DIVISIÓN DE EDUCACION
E INVESTIGACION MEDICA

Jefe de Educación e Investigación Médicas

Dr. David González Bárcena

Titular del Curso de Endocrinología

Dr. Manuel Vadillo Buenfil

Asesor de Tesis

Dr. Nacú Aureo Caracas Portilla

Residente de Endocrinología

NÚMERO DEFINITIVO DEL PROTOCOLO

98-690-0164

RESÚMEN

Título. Expresión de los receptores para factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) en muestras de hiperplasia prostática benigna en humanos mediante el empleo de estudios de competencia con radioligandos.

Objetivo. Determinar la expresión de los receptores para el factor de crecimiento epidérmico en fracciones crudas de membranas celulares en muestras de tejido con hiperplasia prostática benigna en humanos mediante estudios de competencia con radioligandos.

Material y Métodos. Veinticuatro muestras de pacientes con diagnóstico de hiperplasia prostática benigna fueron estudiadas. Se obtuvieron mediante resección transuretral de próstata en los quirófanos del Hospital de Especialidades Centro Médico La Raza. Conservación, homogenización, centrifugación y ultracentrifugación así como estudios de unión fueron realizados.

Resultados. De las 24 muestras de tejido prostático analizadas 12 presentaron la expresión del receptor para EGF (8 positivos dos cruces y 4 positivos una cruz), 12 no presentaron la expresión para el receptor de EGF. De todas las muestras estudiadas, 3 tuvieron reporte histopatológico de cáncer de próstata de las cuales una expresó sitios de unión al receptor de EGF.

Conclusiones. 1) Estos estudios sugieren la presencia de sitios de unión al receptor para factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) en algunas muestras de tejido prostático humano con hiperplasia prostática benigna y carcinoma de la próstata; 2) Su expresión puede ser determinada complementándolos con estudios de desplazamiento y saturación y 3) El uso de análogos de SS y/o BN pudiera ser beneficioso en el manejo de algunos pacientes con HPB y carcinoma de la próstata en combinación con análogos de la LHRH.

SUMMARY

Title. Expression of the Epidermal Growth Factor Receptors (EGF-R) in samples of benign prostatic hyperplasia (BPH) in humans by the use of radioligand binding assays.

Objective. To determine the expression of the EGF-R in crude membrane fractions of samples of benign prostatic hyperplasia in humans by the use of radioligand binding assays.

Material and Methods. We selected 24 patients with the clinical diagnosis of benign prostatic hyperplasia who underwent transurethral prostatectomy resection in the operating rooms of the Hospital de Especialidades Centro Médico La Raza Mexico City. Conservation, homogenization, centrifugation, ultracentrifugation and binding assays were performed.

Results. Of the 24 samples of prostatic tissue analyzed, 12 presented the expression of the receptor for EGF (8 were ++ and 4+), 12 did not present the expression for the epidermal growth factor receptor. Of all the samples analyzed, 3 had a pathology report of prostate cancer of which only one expressed binding sites to the EGF-R.

Conclusions. 1) These studies suggest the presence of binding sites to the EGF-R in some patients with BPH and Prostate Cancer; 2) Their expression can be determined with additional studies and 3) The use of SS and/or BN analogs could be helpful in the management of some patients with BPH and prostate cancer in combination with LHRH analogs.

ANTECEDENTES.

El cáncer de la próstata y la hiperplasia prostática benigna son dos patologías muy comunes en nuestro medio. La hiperplasia prostática benigna (HPB) es el aumento de volumen debido a un desarrollo anormal de los elementos que constituyen la próstata de carácter benigno y muy frecuente. Se calcula que entre la quinta y la tercera parte de los hombres mayores de 50 años padecen la enfermedad. La HPB es la segunda causa de internamientos hospitalarios para cirugía y la primera causa de consultas en pacientes ambulatorios en los departamentos de Urología (1). Entre la población masculina de 50 años de edad la incidencia de intervención médica y quirúrgica por HPB se estima en 35%(2). El cáncer de próstata constituye la neoplasia maligna más común en el varón en los Estados Unidos de Norteamérica y más del 60% de los casos ocurren en varones mayores de 70 años de edad. Factores ambientales pueden jugar un papel importante en la etiología de estos tumores, ejemplo de ello lo constituyen los japoneses que viven en Hawai que presentan mayor incidencia de cáncer prostático clínico que los varones en Japón. La evidencia de que la castración producía regresión del cáncer de próstata en los varones inició una nueva era en el manejo hormonal del mismo. En la última década ha habido un incremento importante en el número de prostatectomías radicales como tratamiento para el cáncer de próstata localizado clínicamente. A pesar de esto, el 30-40% de los pacientes tendrán progresión de su enfermedad.

La importancia que tiene el manejo hormonal de este tipo de patologías hormono dependientes (3) incluyendo la hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata es evidenciada por la importancia que se le dio al manejo del cáncer prostático avanzado con análogos de hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), por el equipo del Dr. David González Bárcena en este Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional La Raza y su manejo con el análogo D-Trp-6-LHRH en el tratamiento del carcinoma avanzado de la próstata incrementando la calidad de vida de estos pacientes (4).

Con los avances recientes en biología celular y molecular se han descubierto varios factores de crecimiento, receptores, proteasas y otras proteínas celulares importantes. Existe un grupo de sustancias polipeptídicas llamadas factores de crecimiento que juegan un papel importante en la regulación del crecimiento de muchos tipos celulares mediando la transmisión de una señal a través de la membrana celular, un ejemplo de estos es el factor de crecimiento epidérmico.

El receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) es un miembro de la familia de los receptores tirosina-cinasa. Este receptor para factor de crecimiento epidérmico es una proteína que consiste de un dominio extracelular para la unión con su ligando específico (el EGF) y un dominio intracelular en el cual expresa su actividad tirosina-cinasa. La transmisión de la señal se inicia cuando el EGF se une a su receptor en la superficie de la membrana celular y se completa con la generación de un mensaje bioquímico en el interior de la célula por fosforilación de los

residuos de tirosina en una serie de proteínas blanco donde se incluye el mismo receptor para EGF (7). Se ha detectado la expresión de receptores para factor de crecimiento epidérmico en 46.7% de prostatectomías radicales con cáncer de próstata. Algunos investigadores han encontrado que la presencia del receptor para el factor de crecimiento epidérmico en el cáncer de la próstata se correlaciona con el pronóstico clínico del paciente (8). Por estudios de reacción en cadena de la polimerasa se ha determinado la expresión genética de factores de crecimiento. El gen del receptor para el factor de crecimiento epidérmico se ha encontrado en líneas celulares de cáncer de próstata del humano adulto pero no en la próstata fetal ni en las líneas celulares de hiperplasia prostática benigna. Aún falta por determinar completamente la contribución de los factores de crecimiento y sus receptores al crecimiento prostático (7,8). Para entender el papel que juegan los factores de crecimiento en el crecimiento y diferenciación de la próstata es de vital importancia conocer la expresión genética de varios factores de crecimiento y sus receptores en la próstata del adulto. La producción autócrina del factor de crecimiento de transformación alfa y la sobreexpresión del receptor para el EGF podrían contribuir al crecimiento del cáncer prostático andrógeno independiente en el sitio primario y en las zonas de metástasis (9). La administración de factor de crecimiento epidérmico humano promueve la migración de células tumorales prostáticas de manera dependiente de dosis. Hay evidencia de que la capacidad de unión del EGF-R es el único parámetro que está constantemente elevado durante la proliferación celular con respecto a

células en reposo, lo cual muestra una relación entre el EGF-R y el crecimiento celular. Esto apoya la noción de que la regulación ascendente del EGF-R puede ser un mecanismo importante involucrado en el incremento de la velocidad de crecimiento de estas células tumorales (10). El desarrollo de estudios no invasivos para determinar los niveles de factores de crecimiento en el paciente con cáncer de próstata ha motivado a investigadores a buscar factores que aumenten o inhiban la carcinogénesis prostática. Debido a que los factores de crecimiento actúan por un mecanismo autócrino o parácrino, los niveles sistémicos de estos factores de crecimiento (determinados en suero o en orina) no serían de utilidad como marcadores. La medición de factores de crecimiento en el líquido prostático tiene una sensibilidad aceptable (11). Por otro lado, la expresión de la somatostatina y su respectivo receptor ha sido documentada en tumores de próstata de animales de experimentación sin tratamiento hormonal previo, pero estos mismo animales al ser tratados con análogos de la somatostatina disminuyen su afinidad a estas hormonas lo que puede indicar una desensibilización homóloga de éstos receptores al ser tratados. Además estos receptores también pueden ser modificados sobre todo en su máxima capacidad de unión al utilizar tratamiento no específico con otra hormona lo que indica que puede presentarse una regulación heteróloga de estos; además, tumores tratados con análogos de la somatostatina pueden modificar los receptores a factores de crecimiento, en especial al EGF e IGF-I reduciendo su capacidad de unión lo que indica que el tratamiento con análogos de la somatostatina en estos tumores

animales además de sus efectos directos poseen efectos indirectos modificando los factores de crecimiento y sus respectivos receptores (10). En muestras humanas de próstata Reubí y Schally no pudieron demostrar la presencia de receptores para somatostatina muy probablemente debido a que los sitios de unión son muy sensibles y pueden dañarse al momento de la preparación de las fracciones de membranas (10,11). Sin embargo, la somatostatina posee efectos directos e indirectos capaces de modificar cambios intracelulares así como modificar las características de unión de los factores de crecimiento así como de sus respectivos receptores. Estudios de biología molecular están dando la pauta de los mecanismos de acción de la somatostatina y sus análogos así como la identificación de los 5 subtipos de receptores con gran especificidad para cada tipo de tumor (12).

Los receptores para el IGF-I y el IGF-II están siendo estudiados con gran énfasis ya que se ha documentado participación en el crecimiento de tejido prostático normal así como el neoplásico. Receptores para el IGF-1 han sido caracterizados en líneas celulares prostáticas como en la DU-145, PC-3 y Dunning R-3327 (13). La capacidad de éstos receptores de ser modificados por análogos no específicos y específicos ha sido estudiada en animales de experimentación, por ejemplo con el uso de los análogos antagonistas de la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GH-RH) donde se ha demostrado que en éstas etapas iniciales de tratamiento puede ocurrir el fenómeno de "up regulation" de los receptores donde la concentración de estos en las líneas celulares DU-145, PC-3 y Dunning R-

3327 transplantadas en animales se incrementó después del tratamiento a corto plazo con estas hormonas muy probablemente como mecanismo compensatorio por la supresión endócrina y local de los niveles de IGF-I (14). Estos antecedentes nos apoyan el objetivo de este trabajo de caracterizar los receptores de EGF en el tejido tumoral de la próstata con la finalidad de seleccionar a los pacientes que ingresarán a tratamiento con hormonoterapia específica así como también tenemos la posibilidad de que sean utilizados como marcadores de pronóstico y de respuesta a tratamiento. El aumento de la incidencia y mortalidad del cáncer de esta glándula nos alientan a buscar nuevas alternativas de tratamiento que nos permitan un mejor manejo así como una mejor calidad de vida no solo en el carcinoma avanzado de la próstata sino también probablemente desde etapas iniciales tanto en el tumor andrógeno-dependiente como en el andrógeno -independiente.

MATERIAL Y MÉTODOS.

SUJETOS.

Se estudiaron los tejidos prostáticos de 24 pacientes operados de resección transuretral de la próstata (RTUP) en este Hospital de Especialidades Centro Médico "La Raza".

MATERIAL.

- 1) Tris-HCL (Tris hidroximetil aminometano hidrocloreuro) anhidra PM=158 (sigma).
- 2) EDTA (Etilenediamina ácido tetracético) PM= 336.2
- 3) Cloruro de Magnesio (Productos Químicos de Monterrey) PM=203.30
- 4) PMSF (Fenilmetilsulfonilfluoruro) PM=174.2 (Sigma)
- 5) Alfa-Monotioglicerol PM=108.2 (Sigma)
- 6) Bacitracina (Sigma)
- 7) Albúmina bovina fracción V (Sigma)
- 8) Hidróxido de sodio PM=40.00 (técnica Química SA)
- 9) DL-Ditiotreitol PM=152.2 (Sigma)
- 10) Tris-Base, PM=121 (Laboratorios Sigma)

HORMONA LIOFILIZADA NO MARCADA:

1. Factor de crecimiento epidérmico de origen recombinante procedente de los laboratorios Amersham o R&D System, con las siguientes características:
 - a) Peso total a utilizar en un vial de 100 µg

- b) Pureza 95%
- c) Actividad DE 50.1 ng/ml (NRK cells)
- d) Estabilidad de 6 meses a 4°C
- e) Fórmula: 10 mM fosfato, 100 mM cloruro de sodio (NaCl), 2% de manitol, pH 6.5
- f) Concentración: Liofilizado de una solución original de 6.5 mg/ml
- g) Esterilidad: Liofilizado a partir de una solución filtrada estéril.
- h) Preparación: E. coli

HORMONA MARCADA:

- a) Iodo-125- EGF Factor de Crecimiento Epidérmico
- b) Procedente de Laboratorio Amersham
- c) 5-25 μ Ci contenidos en un vial
- d) Actividad específica: 33 Tbq/mmol, 900 Ci/mmol para el EGF con ciertas variaciones .
- e) Contenido glicerol acuoso, ácido acético y albúmina sérica bovina (BSA) para EGF.
- f) Conservación a -20°C.

REACTIVOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS BIO-RAD

EQUIPO DE LABORATORIO.

- a) Balanza analítica

- b) Vortex**
- c) Potenciómetro (Beckman)**
- d) Pipetas, gradillas, etc.**
- e) Homogenizador (Tissumizer, Teckmar, Cincinnati, Ohio)**
- f) Centrífuga en frío modelo J2-21 y un Rotor JA20-Max-rpm 20,000 Marca Beckman**
- g) Centrífuga en frío modelo PR-6000 de la Compañía Damon/IEC División.**
- h) Ultracentrífuga Beckman modelo XL-90 con capacidad de giro hasta 90,000 r.p.m. y un rotor de 55.2 Ti 55 r.p.m. serie 746.**
- i) Contador gamma**
- j) Tubos cónicos de poliestireno 12x75 mm.**
- k) Tubos de borosilicato o vidrio de 12x75**
- l) Viales de polipropileno**
- m) Congelador o REVCO a -70°C**
- n) Incubadora (Thelco)**
- ñ) Tubos cónicos de polipropileno.**

MÉTODO.

1. Obtención de la Muestra

Todas las muestras de tumores se obtuvieron en el transoperatorio de pacientes sometidos a resección transuretral de próstata (RTUP) realizadas en los quirófanos del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "La Raza". El tejido obtenido se dividió en 2 fragmentos, uno para estudio histopatológico y el otro para el de receptores. Todas las muestras para caracterizar los receptores fueron tomadas en frío a 0 grados centígrados (en hielo) lavadas con solución salina al 0.9% previamente refrigeradas con el objetivo de eliminar la sangre presente en ellas. También fueron debridadas para eliminar todo tejido conectivo. El peso aproximado de la muestra mayor fue de 1 g.

El otro fragmento del tejido prostático obtenido se fijó en formol al 10% y se incluyeron de 6 a 8 cápsulas dependiendo del peso de las mismas. En los casos de muestras pequeñas, por ejemplo 6 gramos, se incluyeron en su totalidad. Se obtuvo una laminilla por cada cápsula de tejido y se realizó tinción con hematoxilina-eosina para su interpretación y estudio histopatológico.

2. Conservación de las muestras.

Se conservaron en viales de polipropileno entre -70 y -80 grados centígrados en un congelador o REVCO dependiente de nuestro Departamento de Endocrinología y Medicina Nuclear. Su conservación no fue por más de 6 meses que es el límite considerado adecuado para la preservación de tejidos frescos.

3. Preparación del tampón de homogenización.

A.) PARA EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

UTILIZAMOS:

50 mM..... Tris-HCL (tris-hidroximetil-aminometano-hidrocloruro)

PM158 (Laboratorios Sigma).

5 mMEDTA (Acido etilendiamino-tetracético) PM=336.2

5 mMMgCl₂(Cloruro de Magnesio) PM:203.30

30 µg/ml.....Bacitracina.

Para 1000 cc. de agua destilada y pH de 7.4

4.) HOMOGENIZACIÓN DE LOS TEJIDOS.

A.) Se descongelaron las muestras

B.) Se lavaron y debridaron las muestras con solución salina al 0.9% previamente refrigerada retirándose por segunda vez sangre y detritus hasta quedar completamente limpias.

C.) El tejido se pesó calculando el volumen requerido del tampón de homogenización acorde con el peso para homogenizar la muestra.

D.) La muestra se cortó en pequeños fragmentos para facilitar su homogenización.

E.) Los fragmentos se colocaron en tubos de poliestireno, continuando la técnica en frío a 0 grados centígrados. Los tubos se introdujeron en hielo y se les agregó el tampón de homogenización.

F.) Se inició la homogenización utilizando un Polytron serie 2099 distribuido por Beckman Instruments a velocidad máxima de giro de 30,000 r.p.m. con intervalos de 15" (4-5x) y a cero grados obteniéndose una muestra totalmente homogeneizada.

G.) La muestra se centrifugó un primer tiempo en una centrifuga refrigerada marca Beckman modelo J2-21 y un rotor modelo JA-20 Max-rpm-20,000. Los parámetros de ésta centrifugación fueron: 2000 r.p.m. a 4 grados centígrados y durante 10' para la separación de las fracciones celulares, de la cual solo se tomó el sobrenadante.

H.) El sobrenadante se colocó en tubos Beckman para ultracentrifuga de policarbonato de 1x3 ½ pulgadas (25x89) de capacidad; los tubos se calibraron con el tampón de homogenización y se procedió a ultracentrifugar.

I.) Los tubos Beckman se colocaron en un rotor 55.2 Ti 55 r.p.m. serie 746 que fue usado en una centrifuga Beckman modelo XL90 con capacidad de giro de hasta 90,000 r.p.m.

Las muestras se ultracentrifugaron a 35,000 r.p.m. durante 60' a 4 grados centígrados con aceleración y desaceleración máximas. Se obtuvo un botón en el fondo del tubo y se eliminó el sobrenadante obtenido. Se volvió a calibrar el tubo con el tampón de homogenización y de nuevo se

centrifugó con los mismos parámetros. Después de obtener el botón se aforó con el tampón de homogenización (1ml/100 mg de la muestra).

Al aislar las fracciones crudas de membrana se separaron 200 μ l de la muestra para realizar la determinación de proteínas. El remanente se congeló entre -70 y -80 grados centígrados.

J) La determinación de proteínas se llevó a cabo antes de los estudios de unión por medio del Método Bradford utilizando albúmina bovina fracción V. La concentración óptima para la realización de éstos receptores de membrana es entre 30 y 100 μ g/100 μ l).

5) ESTUDIOS DE UNIÓN.

PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE UNIÓN PARA EGF-Rs y para 1000 ml de agua destilada y pH de 7.4

25 mM Tris-HCL.....	3.94 gr.
5 mM EDTA	1.9 g.
5 mM MgCl ₂	0.476 g
0.25 mM PMSF.	0.0435 g
10mM Monotioglicerol.....	0.78 ml
30 μ g/ml Bacitracina.....	0.03 g
0.1% Albúmina Bovina Fracción V.....	1.0 g

Los estudios que se realizaron fueron: Estudios de unión simple.

Se utilizaron para su proceso tubos cónicos de polipropileno para EGF-Rs. Se utilizó para el conteo de la radioactividad un contador Gamma (Micromedic Systems, INC), hormonas marcadas con Iodo-125 y hormonas peptídicas no marcadas.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford, usando un Kit de ensayo proteico procedente de la compañía Bio-Rad siguiendo los siguientes parámetros:

Para la determinación de proteínas se prepara una solución stock de Albúmina bovina fracción V a una concentración de 1mg/1ml. En cada determinación se utiliza una alícuota previamente realizada a una concentración de 1 mg/1ml. para cada determinación.

Etapa 1

Se realizó una curva estándar de albúmina por duplicado a las siguientes diluciones: 100,50,25, 12.5, 6.25

Etapa 2

Por duplicado y en tubos de borosilicato se administraron 100 μ l procedentes de cada dilución con un tubo inicial (blanco) el cual contenía 100 μ l de agua bidestilada.

Etapa 3

En una serie de tubos por duplicado de borosilicato, se administran 100 μ l procedente de cada muestra a determinar, previamente homogeneizada.

Etapa 4

Se administró a cada tubo de la curva estándar y a cada muestra 100 μ l de hidróxido de sodio (NaOH) a una concentración de 0.1 N

Etapa 5

Después de un periodo de incubación de 10 minutos se administró a cada tubo tanto de la curva estándar como de las muestras 5ml. de reactivo Bio-Rad.

Etapa 6

En un lapso menor de 60 minutos se procedió a la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro de la compañía Sequoia-Turner modelo 340 (rango de longitud de onda de 420 a 890 nanómetros (nM) a una longitud de onda de 595 nM.

Etapa 7

Se procedió a graficar y calcular la curva estándar y las muestras problema para determinar la concentración de proteínas.

ESTUDIOS DE UNIÓN PARA EL RECEPTOR DE:

FACTOR DÉ CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

Preparación del Tampón de Unión:

Se prepara a un pH de 7.4 en 1000 ml. de agua bidestilada y se conserva en refrigeración entre 2 y 8 grados centígrados.

1. Se obtienen las muestras de las fracciones de membrana del congelador a -75°C .
2. Las muestras se descongelaron y homogenizaron antes de ser utilizadas.
3. El liofilizado del Lab. Amersham contiene $100\ \mu\text{g}$ que se diluyen en ácido acético al 0.1 N o bien en tampón de homogenización de acuerdo a especificaciones de la compañía.

4. Se utilizó un volumen de ácido acético o tampón 1:1 100 μg =100 μl tomándose 20 μl + 180 μl del tampón de unión. Por lo tanto 200 μl contienen 20 μg de EGF.
5. Se tomaron 40 μl que contiene 4 μg para 2ml. del tampón de unión a una concentración de μM de 10^{-6}M .
6. Se tomó el EGF en frío a partir de la concentración de 10^{-6}M .
7. Se preparó el trazador en medicina Nuclear con 2ml. de tampón de unión con 2 μCi .
8. Todas las muestras se realizaron por duplicado.

UNIÓN TOTAL.

Primero:	Tampón.....	50 μl
	Trazador.....	50 μl
	Membranas.....	50 μl
	Volumen Total.....	150 μl

UNIÓN NO ESPECÍFICA

Primero	Hormona no marcada 10^{-6}M	50 μl
	Trazador.....	50 μl
	Membranas.....	50 μl
	Volumen Total.....	150 μl

9. El periodo de incubación fue a 18°C durante 3hrs.

10. Después del periodo de incubación la reacción se interrumpió con 250 μl del tampón de unión e inmediatamente se centrifugó a 4200 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
11. Luego se aspiró sin tocar el fondo del tubo y se agregaron 500 μl del tampón de unión y se centrifugó a 4200 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
12. Se aspiró nuevamente y se agregaron 500 μl del tampón de unión centrifugando nuevamente a 4200 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C (un total de 3 aspiraciones).
13. Inmediatamente se procedió a contar con el contador Gamma en Medicina Nuclear.
14. Se valoran los resultados determinando la unión específica.
15. Se calcularon los resultados. Plan para desplazamientos.
16. Los tubos para la unión son a partir de tubos cónicos de poliestireno.

B.) ESTUDIOS DE DESPLAZAMIENTO O COMPETENCIA

- Unión Total (TB)-tampón de unión (50 μl)
- Trazador (^{125}I -EGF) (50 μl)
- Fracciones de membrana celular (50 μl)

Unión no específica (NSB) –EGF a las concentraciones de 10^{-6} a 10^{-12} M

12 puntos (50 μl cada uno)

- EGF marcado ^{125}I -(50,000-70,000 cpm/50 μl)
- Fracciones crudas de membrana celular (50 μl).

RESULTADOS.

De las 24 muestras de tejido prostático analizadas tenemos 12 muestras con receptores positivos. La presencia o ausencia de receptor para un ligando dado se determina calculando la unión específica para dicho ligando, la unión específica es el resultado de la diferencia de cuentas por minuto del promedio de los duplicados de la unión total y la unión no específica. Se toma como "receptor negativo" aquel que muestra una cifra menor de 300 cuentas por minuto de unión específica (tomando en cuenta que la radiación de fondo es de alrededor de 100 a 200 cpm), se considera "receptor positivo una cruz" (+) aquellos que muestran la presencia de 300 a 500 cuentas por minuto (cpm) y aquellas muestras que presentaron cifras mayores de 500 cuentas por minuto se les consideró como presencia del receptor para factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) dos cruces (++) de unión específica en el contador gamma respectivamente. Tomando en cuenta estos parámetros, encontramos que de las muestras analizadas, tenemos con receptores positivos dos cruces (++) a 8 muestras y 4 con receptores positivos una cruz (+). El resto de las muestras (12) no tuvieron expresión para este factor de crecimiento (Tablas 3 y 4).

En cuanto al reporte histopatológico de las 24 muestras de tejido prostático tenemos 3 reportes de malignidad (uno con Gleason 2, otro con Gleason 4 y otro con Gleason 9) y 21 con diagnóstico de hiperplasia adenomatosa y fibromuscular (Tablas 1 y 2).

De los 3 pacientes con reporte de adenocarcinoma de próstata, solo 1 tiene presencia de receptores para EGF una cruz (98-0054) que es la muestra con el Gleason más bajo de todas las reportadas con malignidad (Gleason 2).

El reporte de PSA más elevado de estas 24 muestras fue de 153 ng/ml y fue en la muestra número 98-0060 con reporte patológico de Adenocarcinoma de próstata Gleason 9 con receptores para EGF negativos. El reporte de PSA más bajo fue de 0.4 ng/ml en la muestra número 98-0053 con reporte histopatológico de hiperplasia adenomatosa y fibromuscular con receptores para EGF negativos.

De las muestras con receptores para EGF positivos dos cruces (++) el promedio de PSA fue de 4.51 ng/ml y la edad fue similar a la del resto de los grupos (Tablas 3 y 4).

DISCUSIÓN.

La presencia de receptores para factores de crecimiento han sido detectados en la membrana celular de muchos tejidos normales y patológicos. La presencia de estos factores de crecimiento sirve solo para poder predecir el curso de la enfermedad si no también como marcador para ver la respuesta que un paciente va a presentar al tratamiento convencional.

Debido a la importancia que tiene el conocer la presencia de receptores para factores de crecimiento en pacientes con patología como la hiperplasia prostática benigna es necesario conocer la expresión y características de dichos receptores en los pacientes. La hiperplasia prostática benigna ha sido manejada de manera tradicional con tratamiento quirúrgico (resección transuretral de próstata) pero el uso de análogos de LHRH han abierto la visión de los potenciales que tiene el tratamiento médico de estos pacientes (15) y si a eso se agrega que se puede tener el conocimiento del estatus de receptores en un paciente determinado se puede modular el tratamiento hormonal en cada paciente dependiendo de su perfil de receptores a los diferentes factores de crecimiento.

Los pacientes que son sometidos a resección transuretral de próstata presentan en su gran mayoría hiperplasia fibromuscular y adenomatosa pero en 3 de nuestras muestras de tejido prostático se encontró tejido de adenocarcinoma con diferentes grados de Gleason en pocos de los fragmentos enviados, el hecho de que no todos los pacientes

con reporte de malignidad hayan resultado positivos para la presencia del receptor para factor de crecimiento epidérmico nos habla de que hay muchos otros factores involucrados en la génesis y crecimiento de este tipo de tumores entre los que se encuentran el factor de crecimiento epidérmico y la somatostatina entre otros.

Las concentraciones de proteínas fueron adecuadas en todas las muestras solo en una se obtuvo una concentración baja (98-0053) lo cual nos habla del manejo adecuado y de la idoneidad de las muestras.

No se encontró relación entre el nivel de PSA y la expresión del receptor para EGF aunque sí hay relación entre niveles elevados del mismo y el diagnóstico de malignidad en el reporte patológico, tampoco se encontró que la edad fuera factor para la presencia o ausencia de la expresión de este receptor.

Uno de los aspectos interesantes fue observar el hecho de que el nivel de PSA (por lo menos del PSA total) no fue predictivo de benignidad en el tejido prostático fresco obtenido en el transoperatorio de la resección transuretral de próstata.

Estos estudios demuestran la expresión del factor de crecimiento epidérmico en los tejidos prostáticos de nuestros pacientes.

El tamaño de la muestra aunque fue arbitrario por no tratarse de un estudio epidemiológico nos da una clara idea de la presencia del receptor para EGF y su relación con los niveles de PSA y con el diagnóstico histopatológico.

Los resultados en hiperplasia prostática benigna manejados con un antagonista de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) han mostrado excelentes resultados en los aspectos clínicos y bioquímicos de los pacientes, lo que probablemente permita su utilización en forma intermitente en el manejo de esta patología.

Además nuestros primeros resultados en la expresión positiva de receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) sugieren que los análogos de somatostatina o de bombesina pudieran ser utilizados de manera asociada a los análogos de LHRH aumentando su eficacia en estas entidades patológicas.

CONCLUSIONES.

1. Estos estudios sugieren que existe la presencia de receptor para factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) en muestras de tejido prostático humano con hiperplasia prostática benigna y con adenocarcinoma de próstata.
2. Se requerirán mayor número de estudios de desplazamiento y saturación para caracterizar a estos receptores permitiéndonos calcular la K_d (constante de disociación) que nos indique la afinidad del receptor y la B_{max} (máxima capacidad de unión) que nos hable de la concentración del receptor en tejidos de hiperplasia prostática benigna en humanos.
3. La expresión positiva de receptores para EGF sugieren que el uso de análogos de somatostatina y/o bombesina pudiera ser beneficioso en el manejo de algunos pacientes con HPB y carcinoma de la próstata en combinación con análogos de la LHRH.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Chicharro-Molero J, Burgos Rodríguez R, Sánchez Cruz J, Rosal Samaniego J, Rodero García P, Rodríguez Vallejo J.** Prevalence of Benign Prostatic Hyperplasia in Spanish men 40 years or older. *J Urol* 1998;159:878-82.
2. **McConnell J, Bruskewitz R, Walsh P, Andriole G, Lieber M, Holtgrewe L et al.** The Effect of Finasteride on the Risk of Acute Urinary Retention and the Need for Surgical Treatment Among Men with Benign Prostatic Hyperplasia. *N Engl J Med* 1998;338:557-63.
3. **González-Bárcena D, Ibarra Olmos MA, García-Carrasco F, Gutiérrez SC, Comaru-Schally AM, Schally AV.** Influence of D-Trp-6-LHRH on the survival time in patients with advanced pancreatic cancer. *Biomed & Pharmacother.* 1989;43:313-7.
4. **González-Bárcena D, Pérez SP, Berea D, Graef-Sánchez A, Becerril MM, Comaru-Schally.** Persistent Blockade of the pituitary-gonadal axis in patients with prostatic carcinoma during chronic administration of D-Trp-6-LHRH. *The Prostate* 1986;9:207-15.
5. **Sherrill JM, Kyte J.** Activation of Epidermal Growth Factor Receptor by Epidermal Growth Factor. *Biochemistry* 1996;35:5705-18.

6. Moul JW, Maygarden SJ, Ware JL, Mohler JL, Maher PD, Schenkman N et al. Cathepsin D and Epidermal Growth Factor Receptor Immunohistochemistry Does Not Predict Recurrence of Prostate Cancer in Patients Undergoing Radical Prostatectomy. J Urol 1996;155:982-5.

7. Dahiya R, Lee C, Haughney PC, Chui R, Ho R, Deng G. Differential Gene Expression of Transforming Growth Factors Alpha and Beta, Epidermal Growth Factor, Keratinocyte Growth Factor, and their Receptors in Fetal and Adult Human Prostatic Tissues and Cancer cell lines. Urology 1996;48:963-70.

8. Lamm ML, Long D, Goodwin SM, Lee C. Transforming Growth Factor-beta1 Inhibits Membrane association of Protein Kinase C alfa in a Human Prostate Cancer Cell line, PC3*. Endocrinol 1997;138:4657-64.

9. Peng D, Fan Z, Lu Y, DeBlasio T, Scher H, Mendelsohn J. Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody 225 Up-Regulates p27 K1P1 and Induces G1 Arrest in Prostatic Cancer Cell line DU1. Cancer Res 1996;56:3666-9.

10. Fekete M, Redding TW, Comaru-Schally AM, Pontes JE, Connelly RW, Srkalovic G, Schally AV. Receptors for luteinizing hormone-releasing hormone, somatostatin, prolactin, and epidermal growth factor in rat and

human prostate cancers and in Benign Prostate Hyperplasia. *The Prostate* 1989;14:191-208.

11. **Reubi JC, Maurer R, von Werber K, Torhorst J, Klijn JGM, Lamberts SWJ:** Somatostatin receptors in human Endocrine tumors. *Cancer Res* 1987;47:551-558.

12. **Buscail L, Esteve JP, Saint-Laurent N, Bertrand V, Reisine T, O'Carroll AM, Bell GL, Schally AV, Vaysse N, Susini C:** Inhibition of cell proliferation by somatostatin analogue RC-160 is mediated by somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 through different mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1580-1584, 1995.

13. **Pinsky J, Schally AV, Groot K, Halmos G, Szepeshazi K, Zarandi M and Armantis P.** Inhibition of growth of human osteosarcoma by antagonists of growth hormone-releasing hormone. *J Natl Cancer Inst* 1995,87:1787-1794.

14. **Jungwirth A, Schally AV, Pinsky J, Halmos G, Groot K, Armantis P, Vadillo Buenfil M.** Inhibition of in vivo proliferation of androgen – independent prostate cancers by an antagonist of growth hormone-releasing hormone. *British. Journal of Cancer* 1997,75 (11), 1585-1592.

15. **González-Bárcena D, Vadillo Buenfil M, Cortez Morales A, Fuentes García M, Cárdenas Cornejo I, Comaru Schally AM, Schally AV.**Luteinizing hormone releasing hormone antagonist cetrorelix as primary single therapy in patients with advanced prostatic cancer and paraplegia due to metastatic invasion of spinal cord. *Urology* 1995;45:275-81.

REGISTRO Y CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS

TABLA 1

NÚMERO DE LA MUESTRA	TOMA MSTR.	CLAVE	PESO (mg)	VOLUMEN (ml.)	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS (µg/100µl)	REPORTE DE PATOLOGÍA
98-0050	3 Ago 98	MRA	2,200	10	49	(C-8836-98) HAFM
98-0051	11.Ago98	SOJ	500	5	35	(C-9236-98) HAFM, Atrofia Quística/Prost. Crónica
98-0052	25.Ago98	HSA	400	4	42	(C-9892-98) HAFM/Atrofia quística/Prost.Crón Ines
98-0053	2 Sep 98	HVJ	600	6	24	(B-10247-98) HAFM
98-0054	3Sept98	AGV	4,400	20	48.5	(B-10285-98) Ca bien diferenciado Gleason 2 1/187 f
98-0055	4Sept98	PCV	800	7	42	(B-10363-98) HAFM Prostatitis crónica leve
98-0056	10Sept98	RAM	500	5	35	(C-10660-98) AdenoCa Protata bien dif Gleason 4
98-0057	11Sept98	PRD	500	5	35	(C-10737-98) HAFM, Atrofia Glandular quística
98-0058	23Sept98	VTJ	1,400	10	43	(C-11066-98) HAFM Atrofia quística Prost Crónica
98-0059	25Sept98	UGF	400	3	43	(C-11321-98) HAFM Prostatitis crónica
98-0060	28Sept98	CBR	2,400	15	42	(C-11322-98) AdenoCa Pta Gleason 9 (4+5) en 21/60 fragmentos. Prostatitis crónica, HAFM
98-0061	28Sept98	AEA	500	4	43	(C-11316-98) HAFM, Prostatitis crónica calcif. Focal

HAFM = Hiperplasia Adenomatosa y fibromuscular

REGISTRO Y CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS

TABLA 2

NÚMERO DE LA MUESTRA	TOMA MSTR.	CLAVE	PESO (mg)	VOLÚMEN (ml.)	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS ($\mu\text{g}/100\mu\text{L}$)	REPORTE DE PATOLOGÍA
98-0064	5Oct.98	MCR	700	5	42	(C-11589-98) HAFM, Atrofia gland. Quística
98-0065	24Sept98	RCA	100	1	30	(C-11122-98) Prostatitis crónica y aguda.
98-0066	7 Oct.98	ASG	600	4	44	(C-11676-98) HAFM, Prostatitis crónica, Atrofia q.
98-0067	8 Oct.98	VRJA	200	1	35	(C-11763-98) HAFM, Prostatitis crónica
98-0068	15Oct98	PTL	900	7	38	(C-12068-98) HAFM, Prostatitis crónica
98-0069	19Oct98	RJA	1,500	10	45	(C-12215-98) HAFM, Prostatitis crónica, Atrofia q.gl
98-0070	19Oct98	BJJ	400	3	36	(C-12253-98) HAFM, Prostatitis crónica
98-0073	5Nov 98	RML	1,600	10	38	(C-13006-98) HAFM, Atrofia quística
98-0074	9 Nov98	OAC	600	4	37	(C-13099-98) HAFM, Hiperplasia focal cels. Basales
98-0077	12Nov98	GMP	500	4	31	(C-13276-98) HAFM, Atrofia quística
98-0080	16Nov98	BOF	300	2	41	(C-13360-98) HAFM, Hiperplasia focal cels. Basales
98-0081	27Nov98	HMI	500	4	42	(C-13875-98) HAFM, Hiperplasia células basales

HAFM = Hiperplasia Adenomatosa y fibromuscular

RESULTADOS DE ESTUDIOS DE UNIÓN

Tabla 3

MUESTRA	NÚMERO	CLAVE	EDAD (Años)	PSA (ng/ml)	UNIÓN TOTAL χ (cpm)	UNIÓN NO ESPECÍFICA χ (cpm)	UNIÓN ESPECÍFICA (cpm)	RECEPTOR
1	98-0050	MRA	70	3.8	1365.5	945.85	419.65	+
2	98-0051	SOJ	73	3.5	1108.5	867.25	241.25	-
3	98-0052	HSA	71	1.6	979.6	758.6	221	-
4	98-0053	HVJ	59	0.4	1016.0	879.4	136.6	-
5	98-0054	AGV	77	2.9	1294.2	890.35	403.85	+
6	98-0055	PCV	68	5.2	973.05	859.25	113.8	-
7	98-0056	RAM	72	3.48	847.55	799.5	48.05	-
8	98-0057	PRD	78	3.4	1034.35	854.45	179.9	-
9	98-0058	VTJ	56	2.3	1104.65	831.85	272.8	-
10	98-0059	UGF	79	114.8	988.15	888.15	100.0	-
11	98-0060	CBR	71	153	1120.35	840.5	279.85	-
12	98-0061	AEA	74	1.33	1039.65	974.05	65.6	-

RESULTADOS DE ESTUDIOS DE UNIÓN

Tabla 4

MUESTRA	NÚMERO	CLAVE	EDAD (Años)	PSA (ng/ml)	UNIÓN TOTAL χ (cpm)	UNIÓN NO ESPECÍFICA χ (cpm)	UNIÓN ESPECÍFICA (cpm)	RECEPTOR
13	98-0064	MCR	80	5.4	1998.7	1425.05	573.3	++
14	98-0065	RCA	80	4.66	1582.8	1403.7	179.1	-
15	98-0066	ASG	68	8.4	1997.05	1322.55	674.5	++
16	98-0067	VRJ	65	1.1	1932.7	1406.7	526	++
17	98-0068	PTL	63	6.0	1939.55	1395.7	543	++
18	98-0069	RJA	94	20.5	1857.7	1490.55	367.15	+
19	98-0070	JBJ	81	6.8	2185.2	1522.05	663.15	++
20	98-0073	RML	75	3.7	2084.05	1533.5	550.55	++
21	98-0074	OAC	64	3.7	2093.8	1452.25	641.55	++
22	98-0077	GMP	53	0.46	1764.5	1501.25	263.25	-
23	98-0080	BOF	71	2.4	1963.6	1464.5	499.1	+
24	98-0081	HMI	67	0.98	2199.4	1393.75	805.65	++

GLOSARIO.

Autócrino	Efecto autoestimulador de factores endógenos.
BN	Bombesina
Bmax	Máxima capacidad de unión del receptor
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EGF-R	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico.
GHRH	Hormona liberadora de Hormona de Crecimiento
IGF-1	Factor de Crecimiento Insulinoide tipo 1
IGF-1-R	Receptor para el Factor de crecimiento insulinoide
Kd	Constante de disociación
Parácrino	Efecto estimulador local a células vecinas
Rpm	Revoluciones por minuto
RTUP	Resección transuretral de próstata
SS	Somatostatina
SS-R	Receptor para la Somatostatina
Up regulation	Regulación ascendente

ÍNDICE

SECCIÓN	Página
Hoja de firmas	1
Resumen	2
Summary	3
Antecedentes Científicos.....	4
Material y Métodos.....	10
Resultados	22
Discusión	24
Conclusiones	27
Bibliografía	28
Anexos	32