

# TRABAJO FIN DE GRADO



# UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Grado en Medicina

Estudio del sistema inmune en el cáncer de próstata

Autora:

Jéssica Rafaela Gregório Cardoso

Directores:

Dr. Enrique González Billalabeitia  
Enrique Pérez Navarro

Murcia, 14 de mayo de 2024







# TRABAJO FIN DE GRADO



# UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Grado en Medicina

Estudio del sistema inmune en el cáncer de próstata

Autora:

Jéssica Rafaela Gregório Cardoso

Directores:

Dr. Enrique González Billalabeitia

Enrique Pérez Navarro

Murcia, 14 de mayo de 2024

# TRABAJO FIN DE GRADO



**UCAM**  
UNIVERSIDAD CATÓLICA  
SAN ANTONIO

## DEFENSA TRABAJO FIN DE GRADO

DATOS DEL ALUMNO	
Apellidos: Gregório Cardoso	Nombre: Jéssica Rafaela
DNI:14688310	Grado Medicina
Facultad Ciencias de la Salud	
Título del trabajo: Estudio del sistema inmune en el cáncer de próstata	

El Dr. Enrique González Billalabeitia y D. Enrique Pérez Navarro tutores del trabajo reseñado arriba, acreditan su idoneidad y otorgan el V. ° B. ° a su contenido para ir a Tribunal de Trabajo fin de Grado.

En Murcia, a 14 de mayo de 2024

Fdo.:

PEREZ  
NAVARRO  
ENRIQUE -  
48611091Q

Firmado digitalmente  
por PEREZ  
NAVARRO ENRIQUE  
- 48611091Q  
Fecha: 2024.05.13  
20:07:36 +02'00'

Enrique Pérez Navarro  
Bioinformático

Dr. Enrique González Billalabeitia  
Profesor de Oncología y Medicina Paliativa

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero expresar mi gratitud a mis tutores, Enrique González y Enrique Pérez, por su disposición desde el inicio para orientarme con sus sugerencias, solventar los desafíos que encontraba en cada paso y guiarme exitosamente en esta tarea tan novedosa que enfrentamos como alumnos de último curso.

También quiero agradecer al grupo de Biomarcadores en Tumores Genitourinarios del Instituto de Investigación del 12 de Octubre por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto por proporcionarme los resultados. Especial reconocimiento a José Domínguez, biólogo del grupo y experto por me explicar la funcionalidad de la técnica Digital Spatial Profiling.

Al grupo de Investigación Traslacional del Cáncer de Próstata del IMIG, al doctor J. Tudela, así como al Biobanco Nodo 3 de la región de Murcia.

Por fin, quiero expresar mi profundo agradecimiento a mis padres, mi novio y hermano, por su inquebrantable apoyo y amor. Sin ustedes, no estaría donde estoy hoy.





## ÍNDICE

RESUMEN .....	11
ABSTRACT .....	13
ABREVIATURAS.....	15
INTRODUCCIÓN .....	17
OBJETIVOS .....	19
MATERIAL Y MÉTODOS .....	21
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN .....	25
CONCLUSIONES.....	31
ANEXO 1.....	33
BIBLIOGRAFÍA .....	35
TABLA, GRÁFICO Y FIGURA.....	39



## RESUMEN

**Introducción:** El cáncer de próstata es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Frecuentemente se presenta como enfermedad localizada y en un 5% como enfermedad metastásica *de novo*. En este trabajo se pretende evaluar las diferencias observadas en el microambiente tumoral en pacientes que debutan con enfermedad metastásica y en aquellos que lo hacen con enfermedad localizada al diagnóstico.

**Material y métodos:** Se evaluó muestras parafinadas del tumor primario de 184 pacientes tratados con prostatectomía (N=87) o metastásicos *de novo* (N=97) diagnosticados entre 2018 y 2021. Para el análisis espacial digital de las muestras, se empleó el sistema DSP GEOMx® de Nanostring, utilizando el panel GeoMx® Human Protein Assays for nCounter® - IO Content, que contiene diversos módulos como Cell Death, Immune Activation Status, Immune Cell Profiling, Immune Cell Typing, IO Drug Target, MAPK Signaling, Pan-Tumor, PI3K/AKT Signaling, lo que permitió analizar un total de 88 marcadores fenotípicos proteicos.

**Resultados:** Existen diferencias muy significativas entre el microambiente tumoral del tumor primario de pacientes con cáncer de próstata metastásico y aquellos con cáncer de próstata localizado, caracterizado por una menor presencia de células inflamatorias e inmunitarias, incluyendo linfocitos T CD8 y marcadores de activación linfocitaria como CD127, OX40L, CD80, 4-1BB, CD44, CTLA4, GITR, CD27 y LAG3.

**Conclusiones:** Los tumores primarios de los pacientes metastásicos *de novo* presentan un microambiente diferente caracterizado por menor presencia de linfocitos T CD8 y disminución en su activación.

**Palabras clave:** cáncer de próstata, metástasis, sistema inmune, estroma, digital spatial profiling



## **ABSTRACT**

**Introduction:** Prostate cancer is a leading cause of morbidity and mortality. It frequently presents as localised disease and in 5% as de novo metastatic disease. The aim of this study is to evaluate the differences observed in the tumour microenvironment in patients who debut with metastatic disease and those who debut with localised disease at diagnosis.

**Material and methods:** Paraffin-embedded primary tumour samples from 184 patients treated with prostatectomy (N=87) or de novo metastatic (N=97) diagnosed between 2018 and 2021 were evaluated. For the digital spatial analysis of the samples, the GEOMx® DSP system from Nanostring was used, using the GeoMx® Human Protein Assays for nCounter® - IO Content panel, which contains several modules such as Cell Death, Immune Activation Status, Immune Cell Profiling, Immune Cell Typing, IO Drug Target, MAPK Signaling, Pan-Tumor, PI3K/AKT Signaling, which allowed a total of 88 protein phenotypic markers to be analysed.

**Results:** There are highly significant differences between the tumour microenvironment of the primary tumour of patients with metastatic prostate cancer and those with localised prostate cancer, characterised by a lower presence of inflammatory and immune cells, including CD8 T cells and markers of lymphocyte activation such as CD127, OX40L, CD80, 4-1BB, CD44, CTLA4, GITR, CD27 and LAG3.

**Conclusions:** Primary tumours of de novo metastatic patients present a different microenvironment characterised by lower presence of CD8 T lymphocytes and decreased activation.

**Keywords:** prostate cancer, metastasis, immune system, stroma, digital spatial profiling



## ABREVIATURAS

APC: Células presentadoras de antígenos

CEACAM8: Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 8

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

CP: Cáncer de próstata

CTLA-4: Receptor citotóxico 4 asociado al linfocito T

DSP: *Digital Spatial Profiling*

FDC: Células dendríticas foliculares

GITR: Proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides

IL-4: Interleucina-4

LAG-3: Proteína 3 del gen de activación de linfocitos

MAT: Microambiente tumoral

MEC: Matriz extracelular

NK: Células asesinas naturales

PC: Prostate cancer

ROI: *Region of interest* (región de interés)

SSC: Citrato de sodio salino

TCR: Correceptor del receptor de células T

Th2: Células T cooperadoras tipo 2

Treg: Células T reguladoras





## INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata representa un importante desafío en la atención médica a nivel mundial, pues es una de las principales causas de enfermedad y mortalidad<sup>1,2,3</sup>. Cerca de la mitad de los pacientes diagnosticados con cáncer de próstata en etapa temprana se someterá a prostatectomía radical o radioterapia con el objetivo de curar la enfermedad. Sin embargo, alrededor del 30% de estos pacientes experimentarán recurrencia bioquímica<sup>4</sup>.

La progresión del cáncer de próstata generalmente involucra la invasión del sistema linfático y la diseminación sistémica desde los ganglios linfáticos, pero algunos datos sugieren una propagación sincrónica hacia la sangre<sup>5</sup>. Este proceso metastásico implica que las células tumorales primarias entren en la circulación, conocidas como células tumorales circulantes<sup>4</sup>. Estas CTC pueden escapar de la circulación y asentarse en locales distantes, como la médula ósea, dando lugar a las células tumorales diseminadas, lo que contribuye al proceso metastásico<sup>6</sup>.

El cáncer de próstata metastásico es una enfermedad incurable, y las técnicas de imagen actuales no son suficientemente sensibles para detectar células cancerosas<sup>4</sup>. Aunque la metástasis generalmente se manifiesta tardíamente en la enfermedad, la recurrencia en pacientes tratados inicialmente por cáncer de próstata confinado a órganos sugiere un mecanismo de diseminación tumoral que facilita la formación temprana de metástasis<sup>5</sup>. Sin embargo, el cáncer de próstata localizado suele tratarse y curarse típicamente con terapia local, incluyendo prostatectomía o radioterapia<sup>6,7</sup>, una vez que el carcinoma está solamente en la glándula prostática.

Tradicionalmente, se maneja la inmunohistoquímica y la hibridación fluorescente *in situ* de RNA para evaluar la distribución espacial de proteínas, pero hay algunas limitaciones, por eso se han establecido otros métodos como el DSP que permite crear el perfil espacial múltiple de proteínas o RNA adecuado. La importancia de DSP es incrementar la capacidad de multiplexación, permitir análisis secuenciales y simultáneos, con intención de definir la patología tisular e ilustrar biomarcadores que predicen la respuesta del paciente a la terapia<sup>8</sup>.



## **OBJETIVOS**

El objetivo principal es evaluar las diferencias en el microambiente tumoral en el tumor primario del cáncer de próstata asociado con metástasis al diagnóstico comparado con el cáncer de próstata localizado de alto riesgo.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se ha realizado un estudio de carácter traslacional observacional retrospectivo, cuya fuente de datos proviene de la colección BIOPROS, ubicada en el Nodo 3 del Biobanco de la Región de Murcia, construida en el proyecto de investigación PI21/00165 del Instituto de Salud Carlos III coordinado por el Dr. Enrique González Billalabeitia, titulado "El panorama inmunitario del cáncer de próstata con deficiencia de PTEN" (The immune landscape of PTEN-deficient prostate cancer), formando parte de los objetivos delineados en el proyecto. El objetivo principal fue determinar la influencia del fenotipo tumoral, específicamente la presencia de PTEN, en el microambiente tumoral de biopsias de tumores primarios en pacientes de próstata metastásico recién diagnosticados.

La población a estudio fueron 184 pacientes diagnosticados con cáncer de próstata metastásico al debut entre 2018 y 2021 en el Hospital Universitario Morales Meseguer. Se obtuvo una muestra de biopsia tumoral primaria al diagnóstico junto con muestras para el biobanco, incluyendo una en parafina y otra congelada en fresco. La confirmación del diagnóstico de adenocarcinoma de próstata en las muestras fue realizada por el patólogo Julián Tudela Pallarés.

La base de datos analizada contenía información anonimizada e identificada numéricamente de 184 pacientes, siendo importante destacar que en ningún momento se accedió ni se intentó acceder a la identificación personal de los pacientes.

El procedimiento utilizado para la desparafinización y rehidratación de las muestras fue según el protocolo estándar. Las muestras de tejido prostático parafinado se seccionaron en unidades de 5  $\mu\text{m}$  y se montaron en portaobjetos de vidrio. Para el análisis espacial digital de las muestras, se empleó el sistema Digital Spatial Profiling GEOMx® de Nanostring, disponible en el Hospital Universitario 12 de Octubre, utilizando el panel GeoMx® Human Protein Assays for nCounter® - IO Content, que contiene diversos módulos como Cell Death, Immune Activation Status, Immune Cell Profiling, Immune Cell Typing, IO Drug Target, MAPK Signaling, Pan-Tumor, PI3K/AKT Signaling, lo que permitió analizar un total de 88 marcadores fenotípicos proteicos.

Posteriormente a la desparafinización, las muestras se coincubaron con tres anticuerpos fluorescentes para la detección de células tumorales: pancitoqueratina (CK), células inmunitarias (CD45) y macrófagos (CD68), juntamente con un conjunto de marcadores inmune-oncológicos específicos de los anticuerpos marcados. Las sondas se hibridaron con las muestras durante 2 horas a 65°C, seguido de un lavado con tampón SSC. Una vez finalizada la tinción, las sondas se cargaron en el instrumento GeoMx® DSP y se escanearon para crear una representación digital y fluorescente del tejido.

Después, se definieron regiones individuales de interés con un tamaño máximo de 0.28 mm<sup>2</sup>, abarcando todo el núcleo del microambiente tumoral. Los ROI se segmentaron en tres sectores moleculares distintos mediante coloración fluorescente: el tumoral (pan CK+), el estromal (SYTO13) y la población de leucocitos (CD45). Los oligonucleótidos fotocortados se recolectaron a través de aspiración microcapilar, se dispensaron en placas de 96 pocillos y, por último, se digitalizaron utilizando el Sistema nCounter Tecnología NanoString®.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software GeoMx® de NanoString Technologies. Con la intención de asegurar la precisión del análisis, se normalizaron los datos utilizando controles internos y se efectuó un control de calidad con los siguientes criterios de exclusión, área mínima de superficie menor de 1600, recuento mínimo de núcleos inferior a 20, porcentaje de detección de campo de visión inferior a 75, densidad de unión fuera de 0,1 hasta 2,25 y el factor de normalización no está entre 0,3 y 3, permitiendo descartar sondas con menor expresión o que no cumplieran con los estándares.

Antes de aplicar pruebas estadísticas, se filtró tanto los fulles ROIs que eran las muestras donde no se había podido distinguir estroma y epitelio como todas las muestras que no pertenecían a tumor, eliminando los ganglios positivos y negativos. Puesto esto, se normalizó los datos para ver la distribución de los genes housekeeping. Demostrada la normalidad de la distribución, se comparó la expresión en el estroma en las condiciones de tumor metastásico o localizado de cada paciente realizando la prueba del modelo lineal mixto.

De manera a establecer la regulación de expresión o la desregulación de la expresión de los genes, se calcularon los log<sub>2</sub> de los genes. Los log<sub>2</sub>

suministraron una medida relativa de la expresión de células inmunes en el cáncer de próstata, considerando tanto las muestras con tumor metastásico como las con tumor localizado.

Se definió un umbral -1.5 y 1.5 para el  $\log_2$  de cambio de la expresión. Los genes con un  $\log_2$  superior a este umbral se categorizaron como expresión aumentada, mientras que aquellos con un  $\log_2$  inferior se categorizaron como expresión disminuida.

Finalmente, se realizaron ajustes en los valores p mediante el método Benjamini-Hochberg para controlar la tasa de falsos positivos en las variadas comparaciones llevadas a cabo.

El estudio se llevó a cabo en estricto cumplimiento con todas las normativas legales vigentes en investigación. Previamente, obtuvo la aprobación del comité de ética centralizado, Hospital Universitario Morales Meseguer (Anexo 1), como de los distintos comités de ética de cada hospital participante. Los participantes otorgaron su consentimiento informado previamente a su inclusión en el estudio.

## **RESULTADOS**

En este estudio, se examinó a un total de 87 pacientes con metástasis de nuevo y 97 pacientes con cáncer localizado tras prostatectomía radical. Utilizando el sistema DSP GEOMx® de Nanostring, disponible en el Hospital Universitario 12 de Octubre, se analizaron las muestras de tumor primario obtenidas de estos pacientes. A partir de este análisis, se identificaron múltiples regiones de interés para cada paciente (ver Figura 1), las cuales fueron categorizadas según la presencia de metástasis en el microambiente tumoral.

Se llevó a cabo una comparación de biomarcadores relacionados con el sistema inmune, detallados en la Tabla 1, en el estroma. Las moléculas estromales están asociadas con células inmunes e inflamatorias.

Se ha analizado el objetivo secundario, la diferencia de la expresión proteica en el estroma de pacientes con cáncer metastásico y pacientes con

cáncer localizado, descrito en la Tabla 1, donde se visualizan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Puesto esto, se representa los datos en un gráfico volcán, detallado en el Gráfico 1. En los pacientes con metástasis se objetiva una disminución de expresión de todas las proteínas estudiadas en el estroma, valorando el cambio de expresión  $>1.5$  *fold-change* logarítmico de las proteínas se puede ordenar de mayor a menor expresión, CD66b, CD127, IDO1, OX40L, CD80, 4-1BB, CD44, CTLA4, GITR, CD8, CD27, CD14 y LAG3, respectivamente.



## DISCUSIÓN

La investigación en biología del cáncer tradicionalmente ha puesto énfasis en las alteraciones genéticas y epigenéticas como determinantes clave de la malignidad celular. Sin embargo, cada vez más evidencia resalta la importancia crítica del microambiente tumoral en la anatomía y fisiología del tumor. Las células cancerosas no operan en un vacío, sino que establecen interacciones complejas con la MEC y las células estromales, que forman el componente fundamental del MAT<sup>9</sup>.

El microambiente tumoral es un entorno complejo compuesto por una variedad de células diferentes, como vasos sanguíneos, células inmunes, fibroblastos y células de la matriz extracelular<sup>9,10</sup>. Estas células desempeñan roles tanto inmunes como no inmunes y pueden adoptar diversos fenotipos determinados por la expresión de múltiples proteínas. Estas proteínas se organizan en disposiciones espacialmente estructuradas, lo que da lugar a nichos microambientales, gradientes de nutrientes e interacciones directas entre células<sup>10</sup>. Esta adaptabilidad del entorno tumoral permite que las células cancerosas se ajusten y proliferen de manera eficiente, lo que disminuye la probabilidad de que sean detectadas y eliminadas por el sistema inmune del cuerpo. Este fenómeno subraya la complejidad del microambiente tumoral y destaca su papel crucial en el desarrollo y progresión del cáncer<sup>9</sup>.

El uso de técnicas avanzadas como el DSP permite no solo comprender mejor la dinámica celular subyacente a la malignidad del cáncer de próstata sino también desarrollar estrategias terapéuticas que aborden específicamente las alteraciones en el microambiente tumoral. Este enfoque promete transformar los paradigmas actuales de tratamiento, dirigiendo la terapéutica hacia intervenciones más personalizadas y efectivas basadas en el perfil inmune y estromal individual de cada tumor<sup>10</sup>.

Los marcadores analizados en este estudio están estrechamente relacionados con los linfocitos T y su activación.

La proteína LAG3 es una proteína codificada por el gen LAG3 en humanos, localizada en superficie celular con diversos efectos biológicos en la función de las células T, presentando un efecto inhibitorio inmunológico<sup>9, 11</sup> que

se relaciona con los receptores activadores CD4 o CD8 ligados con la quinasa LCK<sup>12</sup>.

La proteína CD14 es una proteína que se expresa en células del sistema inmunológico, como los macrófagos, y está involucrada en la detección de patógenos y la respuesta inmune innata. En relación con el cáncer suele estar involucrado en la regulación de la respuesta inmunitaria contra las células cancerosas. Algunos estudios han demostrado que niveles elevados de CD14 pueden estar asociados con un mayor riesgo de ciertos tipos de cáncer, mientras que otros han sugerido que el CD14 puede ayudar a activar una respuesta inmune efectiva contra las células cancerosas<sup>13,14</sup>.

El CD27 es una proteína importante para la inmunidad de las células T, regulando la activación de las células B y la síntesis de inmunoglobulinas mediante su interacción con el ligando CD70. Se encuentra en células T efectoras, NK y células B activadas, y puede liberarse como una forma soluble después de la activación celular. La unión de CD27 a CD70 activa una cascada de señalización que mejora la diferenciación y expansión de las células T, fortaleciendo la supervivencia y memoria de las células T citotóxicas y aumentando la producción de ciertas citoquinas<sup>15</sup>.

La proteína CD8 es una glicoproteína transmembranal que actúa junto con TCR en la señalización y facilita las interacciones entre las células T citotóxicas y los antígenos. Se expresa principalmente en la superficie de las células T citotóxicas, pero también está presente en células NK, timocitos corticales y células dendríticas, y sirve como marcador para la población de células T citotóxicas. El dominio extracelular similar a la inmunoglobulina variable de CD8- $\alpha$  interactúa con la porción  $\alpha 3$  de la molécula MHC de clase I, manteniendo unidas a la célula T citotóxica y la célula diana durante la activación específica del antígeno<sup>16</sup>.

El GITR (CD357) es una proteína expresada en las células Tregs CD25+CD4+, esencial para mantener la activación y supervivencia celular tras la activación de las células T. Actúa como un receptor de superficie coestimulador y su señalización tiene diversos efectos en diferentes tipos de células T, desde la reducción del umbral de activación hasta la promoción de la

resistencia a la supresión inmunitaria. En las células T CD8+, su señalización reduce el umbral de activación de CD28 o induce la expresión de CD137 en las células de memoria. En las células T reguladoras CD4+, promueve su expansión, inhibe su capacidad supresora y mejora la resistencia de las células T efectoras a la supresión<sup>17</sup>.

La proteína CTLA-4 (CD152), desempeña la función de control inmunitario, regulando las respuestas del sistema inmunológico. Aunque CTLA-4 se expresa de manera constitutiva en las células T reguladoras, su expresión se eleva solo en las células T convencionales después de la activación, lo que es notable en el contexto del cáncer. Actúa como un "interruptor" al unirse a CD80 o CD86 en la superficie de las células presentadoras de antígenos. En humanos, la proteína CTLA-4 está codificada por el gen CTLA-4 y pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas, transmitiendo una señal inhibitoria a las células T activadas<sup>18</sup>.

El CD44 es una glicoproteína de la superficie celular importante en diversas funciones, como interacción, adhesión, migración celular y en la activación linfocitaria. La coexpresión de CD44 y CD25 sirve como marcador de memoria en células T. En el cáncer, CD44 desempeña un papel multifacético, siendo evidente en algunos estudios que la elevación de niveles de expresión de CD44 se relacionan con el peor pronóstico de la enfermedad, además es un indicador implicado en el cáncer metastásico<sup>19</sup>.

La proteína 4-1BB (CD137) se encuentra en la superficie de leucocitos y células no inmunes, y desempeña un papel crucial como molécula coestimuladora en el control inmunitario, además de representar un posible objetivo en la inmunoterapia contra el cáncer. Su expresión es detectable únicamente en la superficie celular después de que los linfocitos T son activados por las APC, donde se integra en las células T CD4+ y CD8+. Además de en las células T, CD137 también se encuentra en una variedad de células inmunes y no inmunes, como monocitos, células NK, células dendríticas, FDC, condrocitos, neuronas, astrocitos, microglía y células endoteliales<sup>20</sup>.

El CD80, conocido como B7-1, es una proteína de membrana esencial en la regulación de la respuesta inmunitaria de las células T, unida con CD86,

interactúa con receptores coestimuladores en las células T, como CD28 y CTLA-4. Esta interacción desencadena señales coestimuladoras que afectan la activación y diferenciación de las células T. Además, CD80 juega un papel clave en la activación de células dendríticas y citotóxicas. Su expresión se incrementa en respuesta a la presencia de microbios y citocinas, garantizando la presencia de moléculas coestimuladoras en el momento adecuado para modular la respuesta inmunitaria<sup>9,18</sup>.

La proteína OX40-L proporciona una señal de supervivencia para los linfocitos T y favorece el desarrollo de células T de memoria. La molécula OX40 se encuentra en la superficie de linfocitos T activados, principalmente en células T CD4+, pero también en células NK y neutrófilos<sup>21,22</sup>.

La proteína IDO-1 es una enzima inmunomoduladora, producida por células inmunorreguladoras como los macrófagos alternativamente activados. Su función incluye la supresión de células T y células NK, la generación de células Tregs y células supresoras derivadas de la médula ósea, así como el apoyo a la angiogénesis. Estos mecanismos son esenciales en el desarrollo del cáncer, facilitando la evasión de las células tumorales del sistema inmunológico a través de dos principales mecanismos: el agotamiento de triptófano en el microentorno tumoral y la producción de catabolitos citotóxicos, que afectan a linfocitos T y células NK<sup>23,24</sup>.

La proteína CD127, conocida como receptor de interleucina-7, desempeña un papel fundamental en el desarrollo de las células inmunitarias llamadas linfocitos, siendo expresada en varias células T de tipo naïve y de memoria. Estudios en ratones que han sido modificados para no expresar esta proteína sugieren que su función principal es prevenir la apoptosis durante la diferenciación y activación de los linfocitos T<sup>25</sup>.

La proteína CD66b, conocida como CEACAM8, desempeña un papel crucial en la adhesión celular, la migración celular y la unión a patógenos. Esta proteína se expresa de manera exclusiva en los granulocitos y se utiliza como marcador característico de esta célula inmune<sup>26,27</sup>.

Las células T desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmune adaptativa, siendo vitales para eliminar patógenos específicos. Las disfunciones

en su desarrollo y función se relacionan con diversas enfermedades humanas, desde inmunodeficiencias hasta enfermedades autoinmunes y alérgicas. Avances recientes en la comprensión de la inmunidad antitumoral mediada por células T y el agotamiento de estas células han impulsado tratamientos innovadores para varios tipos de cáncer, como los inhibidores de puntos de control y las células T reactivas a antígenos<sup>11</sup>.

Es importante resaltar que en este estudio la disminución en la expresión de linfocitos T CD8 y de los marcadores de activación en pacientes con metástasis de tumores de próstata sugiere la presencia de un ambiente de mayor tolerancia inmunológica en estos pacientes. Así, en pacientes con metástasis hay una respuesta inmunitaria menos activa comparativamente con el cáncer de próstata localizado. Esto podría deberse a mecanismos inmunosupresores presentes en el microambiente tumoral, los cuales podrían estar inhibiendo la respuesta inmunitaria antitumoral, facilitando la progresión tumoral al permitir que las células tumorales evadan y destruyan parte del sistema inmunitario.

En conclusión, los hallazgos del estudio sugieren que existe una diferencia en el microambiente tumoral entre pacientes con cáncer de próstata metastásico y aquellos con tumores localizados, caracterizado por una menor presencia de células inflamatorias e inmunitarias en los pacientes con cáncer metastásicos al debut. Este hallazgo podría tener implicaciones en el pronóstico y la respuesta de estos pacientes a la inmunoterapia.



## **CONCLUSIONES**

Una vez analizado los objetivos de este trabajo, podemos concluir que se ha realizado el análisis diferencial de la expresión proteica entre el compartimento estromal según la presencia de células inmunes en pacientes con metástasis, hallando resultados significativamente estadísticos. Además, los tumores con metástasis se asocian con menor expresión en el estroma, correlacionando con menor proliferación celular y menor respuesta inmune antitumoral, lo cual implica un peor pronóstico.

Así se verifica que la conclusión cumple con los objetivos del estudio, de caracterizar el compartimiento estromal del microambiente tumoral en pacientes metastásicos siendo de utilidad para posteriores estudios de inmunoterapia frente a los marcadores bajo expresados encontrados en el estudio.





## ANEXO 1

Dra. María Dolores Nájera Pérez  
Presidenta del CEIm/CEI Hospital General Universitario José María Morales Meseguer

### CERTIFICA

**1º.** Que el CEIm/CEI Hospital General Universitario José María Morales Meseguer en su Reunión del día 06/05/2022, Acta EXTRAORDINARIA ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

**Título:** Estudio: "El panorama inmunitario del cáncer de próstata con deficiencia de PTEN". (The immune landscape of PTEN defective prostate cancer.)

**Código Promotor:** PI21/01165 **Código**

**Interno:** EST: 11/22 **Promotor:** Instituto De  
Salud Carlos III

**Versión Protocolo Evaluada:** Versión Enero 2022

**Versión Hoja Información al Paciente Evaluada:** Versión Enero 2022

**Versión Hoja Información al Paciente tras ACLARACIONES:** Versión 1.0 de 29 de Abril de 2022. "Componente inmune en el cáncer de próstata asociado a la pérdida de PTEN".

**Fecha Entrada:** 28/01/2022

**Fecha Entrada ACLARACIONES:** 29 de Abril de 2022.

**Investigador Principal :Dr. Enrique González Billalabeitia. Oncología Médica**  
(actualmente se encuentra en el Hospital 12 de Octubre de Madrid).

**✚ Investigadores Colaboradores del Hospital "Morales Meseguer":**

- Dr. Antonio Rosino de Urología.
- Dr. Tudela de Anatomía Patológica.

**2º.** Considera que:

- Se respetan los principios éticos básicos, metodológicos y legales, por lo que es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.

**3º.** Por lo que este CEIm/CEI emite un **DICTAMEN FAVORABLE.**

Lo que firmo en Murcia, a 06 de Mayo de 2022



Dra. María Dolores Nájera Pérez  
Presidenta del CEIm-CEI Hospital General Universitario José María Morales Meseguer

**Nota:** Se recuerda la obligación de:

- Enviar un **informe de seguimiento anual** y el **informe final** que incluya los resultados del estudio (si el estudio dura menos de un año, con el informe final será suficiente).



## BIBLIOGRAFÍA

1. Attard G, Parker C, Eeles RA, Schröder F, Tomlins SA, Tannock I, et al. Prostate cancer. *Lancet*. 2016;387:70–82.
2. Nelson WG, Marzo AM De, Isaacs WB. Prostate Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2003;349(4):366–81. Available from: [https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra021562?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub 0pubmed](https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra021562?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub 0pubmed)
3. Sartor O, Bono JS de. Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 Jun 25;378(7):1–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29412780/>
4. Schilling D, Todenhfer T, Hennenlotter J, Schwentner C, Fehm T, Stenzl A. Isolated, disseminated and circulating tumour cells in prostate cancer. *Nat Rev Urol* [Internet]. 2012;9(8):448–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2012.136>
5. Merritt CR, Ong GT, Church SE, Barker K, Danaher P, Geiss G, et al. Multiplex digital spatial profiling of proteins and RNA in fixed tissue. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2020;38(5):586–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41587-020-0472-9>
6. Toom E van der, Axelrod H, Rosette J de la, Reijke T de, KJ Pienta A, Valkenburg K. Prostate-specific markers are required to identify rare prostate cancer cells in liquid biopsies. *Nat Rev Urol*. 2019;16(1):7–22.
7. Kerkmeijer LGW, Groen VH, Pos FJ, Haustermans K, Monninkhof EM, Smeenk RJ, et al. Focal Boost to the Intraprostatic Tumor in External Beam Radiotherapy for Patients with Localized Prostate Cancer: Results from the FLAME Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol*. 2021;39(7):787–96.
8. Awamlh BAH AI, Wallis CJD, Penson DF, Huang L-C, Zhao Z, Conwill R, et al. Functional Outcomes After Localized Prostate Cancer Treatment. *J Am Med Assoc*. 2024;331(4):302–17.
9. Pitt JM, Marabelle A, Eggermont A, Soria JC, Kroemer G, Zitvogel L. Targeting the tumor microenvironment: Removing obstruction to anticancer

- immune responses and immunotherapy. *Ann Oncol.* 2016;27(8):1482–92.
10. Elhanani O, Ben-Uri R, Keren L. Spatial profiling technologies illuminate the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 2023;41(3):404–20.
  11. Chopp L, Redmond C, O’Shea JJ, Schwartz DM. From thymus to tissues and tumors: A review of T-cell biology. *J Allergy Clin Immunol.* 2023;151(1):81–97.
  12. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 2004;21(4):503–13.
  13. Sharygin D, Koniaris LG, Wells C, Zimmers TA, Hamidi T. Role of CD14 in human disease. *Immunology.* 2023;169(3):260–70.
  14. Pallett LJ, Swadling L, Diniz M, Maini AA, Schwabenland M, Gasull AD, et al. Tissue CD14+CD8+ T cells reprogrammed by myeloid cells and modulated by LPS. *Nature.* 2023;614(7947):334–342.
  15. Ranheim EA, Cantwell MJ, Kipps TJ. Expression of CD27 and its ligand, CD70, on chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 1995;85(12):3556–65.
  16. Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, et al. Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Cell.* 2007;27(4):670–84.
  17. Riccardi C, Cifone MG, Migliorati G. Glucocorticoid hormone-induced modulation of gene expression and regulation of T-cell death: Role of GITR and GILZ, two dexamethasone-induced genes. *Cell Death Differ.* 1999;6(12):1182–9.
  18. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:515–48.
  19. Mesrati MH, Syafruddin SE, Mohtar MA, Syahir A. CD44: A multifunctional mediator of cancer progression. *Biomolecules.* 2021;11(12):1850–82.
  20. Vinay DS, Kwon BS. Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol.* 1998;10(6):481–9.

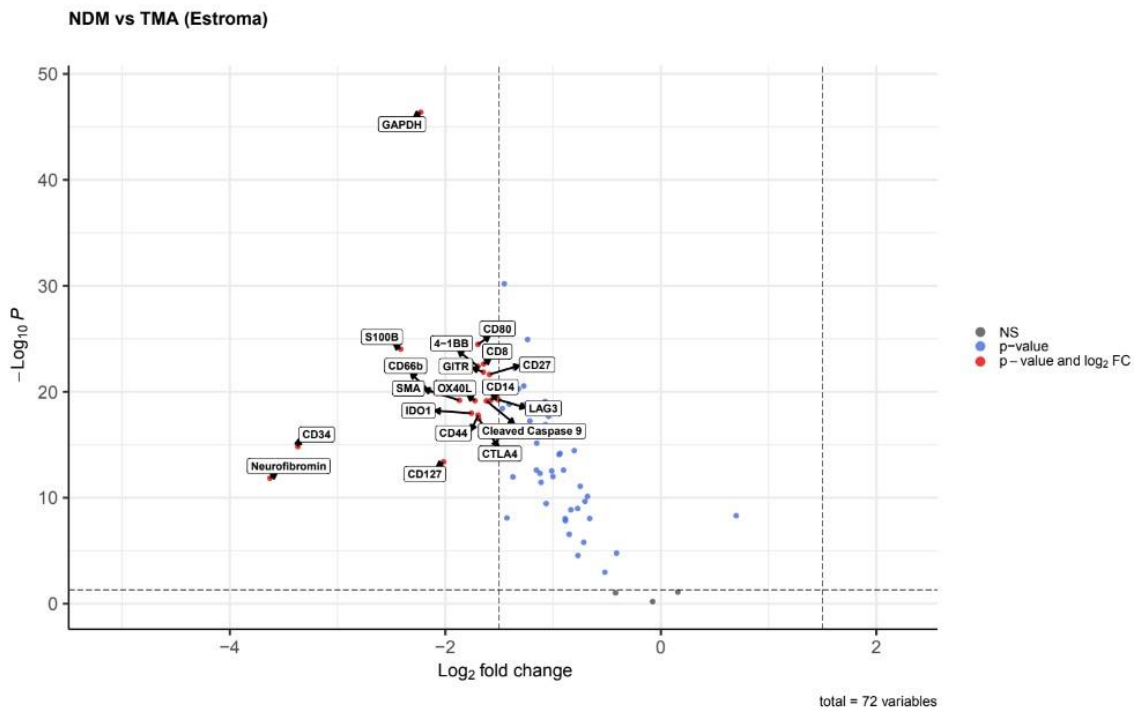
21. Hirschhorn D, Budhu S, Kraehenbuehl L, Gigoux M, Chow A, Ricca JM, et al. T cell immunotherapies engage neutrophils to eliminate tumor antigen escape variants. *Cell*. 2023;186(7):1432–47.
22. Taraban VY, Rowley TF, O'Brien L, Claude Chan HT, Haswell LE, Green MHA, et al. Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses. *Eur J Immunol*. 2002;32(12):3617–27.
23. Fangxuan L, Rupeng Z, Shixia L, Juntian L. IDO1: An important immunotherapy target in cancer treatment. *Int Immunopharmacol*. 2017;47:70–7.
24. Mulder K, Patel AA, Kong WT, Piot C, Halitzki E, Dunsmore G, et al. Cross-tissue single-cell landscape of human monocytes and macrophages in health and disease. *Immunity*. 2021;54(8):1883–900.
25. Barata JT, Durum SK, Seddon B. Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease. *Nat Immunol*. 2019;20(12):1584–93.
26. Yoon J, Terada A, Kita H. CD66b Regulates Adhesion and Activation of Human Eosinophils. *J Immunol*. 2007;179(12):8454–62.
27. Berling B, Kolbinger F, Grunert F, Thompson JA, Brombacher F, Buchegger F, et al. Cloning of a carcinoembryonic antigen gene family member expressed in leukocytes of chronic myeloid leukemia patients and bone marrow. *Cancer Res*. 1990;50(20):6534–9.



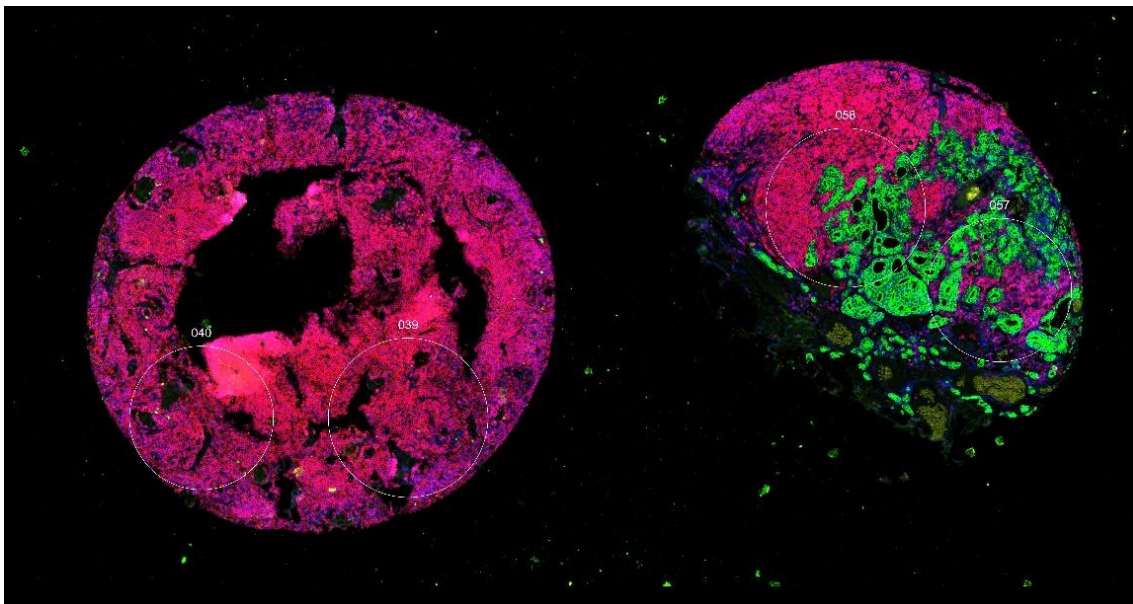
## TABLA, GRÁFICO Y FIGURA

Target name	Log2	Pvalue	Adjusted pvalue
CD66b	-2.148214798	8.22511E-21	3.7013E-20
CD127	-2.016616015	4.16897E-14	6.67036E-14
IDO1	-1.757395817	1.06146E-18	2.63534E-18
OX40L	-1.724868168	6.95394E-20	2.49129E-19
CD80	-1.697959761	3.44365E-25	4.95886E-24
4-1BB	-1.697492836	3.94734E-23	3.15787E-22
CD44	-1.695572179	1.60461E-18	3.85107E-18
CTLA4	-1.690802694	3.48796E-18	7.84791E-18
GITR	-1.646563279	1.42941E-22	8.57644E-22
CD8	-1.644920073	2.44198E-23	2.19778E-22
CD27	-1.590173386	2.34115E-22	1.29664E-21
CD14	-1.577401596	6.31921E-20	2.45887E-19
LAG3	-1.509199047	5.5107E-20	2.33395E-19

**Tabla 1.** Expresión diferencial en el estroma, según expresión proteica en pacientes con cáncer de próstata metastásico.



**Gráfico 1.** Gráfico volcán que representa la expresión proteica en el estroma tumoral, con un Log2 Fold change de -1.5 y P value de <0.05, en pacientes con tumor metastásico (a la izquierda) vs pacientes con tumor localizado (a la derecha).



**Figura 1.** Imagen de un punch (muestra de paciente dentro del TMA) que presenta al mismo tiempo tejido normal y tejido tumoral infiltrante con presencia de infiltrado linfocitario (rojo).





